PARIJS

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES

FACULTÉ DE MÉDECINE COCHIN PORT-ROYAL

Année 1972 **THÈSE** N° 165

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplome d'état)

PAR

Dominique FANNIERE épouse FOULQUIER

née le 16 mai 1946 à Paris

PARIJS

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

ETUDE DE LA COAGULATION SUR MICROPRELEVEMENTS CAPILLAIRES

Président : Monsieur J.P. SOULIER Professeur

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES

FACULTÉ DE MÉDECINE COCHIN PORT-ROYAL

Année 1972 **THÈSE** N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplome d'état)

PAR

Dominique FANNIERE épouse FOULQUIER

née le 16 mai 1946 à Paris

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

ETUDE DE LA COAGULATION SUR MICROPRELEVEMENTS CAPILLAIRES

Président : Monsieur J.P. SOULIER Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ETUDE DE LA COAGULATION SUR MICROPRELEVEMENTS CAPILLAIRES

Président de Thèse.

Professeur J.-P. SOULIER
Directeur du Centre National
de Transfusion Sanguine

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543517_0037

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur J.P. Soulier, qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur F. Josso qui, par ses directives et ses conseils, m'a permis d'entreprendre et de mener à bien cette thèse.

Je remercie le Docteur A. Hurlet, dont l'aide et les travaux ont grandement contribué à l'élaboration de cette thèse.

E T U D E D E L A C O A G U L A T I O N

SUR MICROPRELEVEMENTS CAPILLAIRES

P L A N

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE: DOSAGE SPECIFIQUE DES PROTEINES PLASMATIQUES DE LA COAGULATION

Introduction

-1- Matériel et méthodes

I. Matériel à prélèvement

II. Technique du prélèvement

III. Traitement des échantillons

IV. Méthodes de dosage

V. Facteurs de correction

-2- Résultats

I. Corrélations entre les résultats des microdosages effectués sur sang capillaire et sur sang veineux; influence du temps de prélèvement.

II. Corrélations entre les résultats des microdosages sur sang capillaire et des dosages classiques.

III. Dosage du fibrinogène

IV. Dosage du facteur stabilisant de la fibrine (facteur XIII).

-3- Discussion

DEUXIEME PARTIE: ESTIMATION DE LA COAGULABILITE GLOBALE IN VITRO SUR SANG CAPILLAIRE

Introduction

-1- Matériel et méthodes

I. Matériel à prélèvement

II. Réactifs

III. Technique du prélèvement

IV. Traitement des échantillons

V. Méthode de lecture.

-2- Résultats

I. Valeurs normales

A. Résultats chez les sujets normaux: étude d'un échantillon de cent trente sujets.

B. Reproductibilité

C. Comparaison entre le temps de recalcification du plasma riche en plaquettes et le temps de recalcification du sang capillaire.

D. Activation normale de la coagulation au cours du saignement.

II. Pathologie

A. Pathologie congénitale de la coagulation

B. Thrombopénies

III. Traitements anti-coagulants.

A. Antagonistes de la vitamine K.

B. Héparinothérapie.

-3- Discussion

TROISIEME PARTIE:SIGNIFICATION DE L'ACTIVATION DU SYSTEME DE LA COAGULATION IN VIVO.

CONCLUSION

-:-:-:-:-:-:-:-:-

N.B. Par souci d'homogénéité,nous avons inclus en première partie de ce travail une étude réalisée par le docteur Anne Hurlet (Dosage spécifique des protéines plasmatiques de la coagulation sur micro-prélèvements capillaires).

L'exploration de l'hémostase, et notamment le dosage des protéines plasmatiques de la coagulation prend une importance croissante dans l'investigation clinique. Cet intérêt ne se limite pas à la recherche des mécanismes et des causes des syndromes hémorragiques et des thromboses. L'étude analytique de la coagulation apporte souvent des arguments diagnostiques et pronostiques dans des situations sans expression clinique d'un trouble de l'hémostase.

Par ailleurs, une estimation de la "coagulabilité globale" in vitro reste nécessaire au dépistage des troubles majeurs de la coagulation, permettant d'orienter les dosages spécifiques (hémophilie par exemple).

En pratique quotidienne, elle est également indispensable à la surveillance des traitements anticoagulants, notamment l'héparinothérapie, qui trouvent des indications de fréquence croissante dès les premiers jours de la vie.

L'usage de ce mode d'exploration est souvent limité, chez l'enfant, par les quantités de sang requises par les méthodes classiques, a fortiori lorsque les examens doivent être fréquemment répétés, et par la nécessité d'un prélèvement veineux ou artériel qui doit en outre être impeccable. Ces difficultés sont surtout sensibles chez le nouveau-né, et a fortiori le prématuré. Or il s'agit là de sujets chez qui l'étude de l'hémostase est particulièrement intéressante et utile (1 -9-13-17-18-25)

Aussi la mise au point de micro-méthodes d'exploration de la coagulation sur sang capillaire apparaît-elle indispensable.

Il a déjà été tenté de réaliser sur sang capillaire le dosage spécifique de certains facteurs plasmatiques de la coagulation, notamment celui du facteur VIII dans le but de dépister l'hémophilie chez l'enfant (11-12-24-28-). Mais la plupart des auteurs ont eu pour principal but de transposer sur sang capillaire les épreuves globales ou semi-analytiques habituellement effectuées sur sang veineux (8-10-19-20-28-).

L'objet du présent travail a été la mise au point sur micro-échantillons de sang capillaire:

- d'une part, de méthodes de dosage spécifique des dix protéines plasmatiques de la coagulation en déterminant avec précision les conditions de leur validité;
- d'autre part, d'une méthode d'estimation de la "coagulabilité globale" in vitro (temps de recalcification du sang capillaire dilué citraté).

P R E M I E R E P A R T I E

DOSAGE SPECIFIQUE DES PROTEINES PLASMATIQUES DE LA COAGULATION

Les protéines plasmatiques de la coagulation sont toujours dosées à de fortes dilutions du plasma obtenu par ponction veineuse.

Pour les microméthodes, la dilution est effectuée sur le sang total aussitôt après le prélèvement capillaire, l'échantillon témoin étant prélevé de la même manière.

A partir de ce principe, nous nous sommes constamment attachés à appliquer les méthodes maintenant classiques de dosage, afin que tout technicien entraîné puisse aisément passer aux manipulations sur sang capillaire, sans autre apprentissage que celui du prélèvement.

L'étude a porté sur plus de cent sujets, adultes, enfants, nouveau-nés et prématurés; normaux ou atteints d'affections diverses.

Chez les mêmes sujets ont été comparés:

1. Les résultats obtenus par la méthode classique sur prélèvement veineux et par microméthode sur sang capillaire.
2. Les résultats obtenus par microméthode effectuée sur sang capillaire et sur sang veineux.

-1- Matériel et méthodes

I- Matériel à prélèvement

A)- Prélèvement capillaire: micropipettes de verre calibrées de 50µl et de 100µl; tubes héparinés pour micro-hématocrite; microlances (Blood lancet, B.D.Mérieux); pommade au silicone (Hémolube, Biolyon); chronomètres; tubes à hémolyse en matériel hydrofugé (verre siliconé, plastique); récipient contenant de l'eau chaude (45°).

Pour la dilution du sang, nous avons utilisé la formule de DORMANDY (6) qui, après divers essais, nous a paru excellente*.

- Citrate trisodique 5 H_2O 2g
- Chlorure de sodium 5,6g
- Tampon véronal-acétate iso-osmotique au plasma, pH 7,35 ..... 200 ml
- Eau distillée ..... qsp ..... 1000 ml

Avant le prélèvement, on prépare une série de tubes contenant respectivement 1,9 - 0,95 - 0,9 - 0,4ml de diluant.

---

*: Pour le dosage du fibrinogène, notamment chez le nouveau-né, il est recommandé d'ajouter à cette solution diluante 1,31g d'acide epsilon-amino-caproïque par litre (0,01M). L'acide epsilon-amino-caproïque à cette concentration n'ayant pas d'influence sur le dosage des autres facteurs de la coagulation, cette solution diluante modifiée peut être utilisée pour l'ensemble des prélèvements.

B)- Prélèvement veineux: il est effectué selon la technique habituelle en prélevant 9 volumes de sang sur un volume de citrate trisodique 0,13M.

Pour effectuer les microdosages sur sang veineux citraté total, nous avons utilisé également le diluant recommandé à cet effet par DORMANDY, identique au précédent à l'exception du citrate dont la concentration est ici de 1,5 g/l.

II- Technique du prélèvement

A)- Prélèvement capillaire

- La main ou le pied sont réchauffés trois minutes par immersion dans l'eau chaude, puis séchés et passés à l'alcool; l'endroit du prélèvement (pulpe du doigt, talon) est recouvert d'une fine couche d'Hémolube.

- La pointe de la microlance est enfoncée d'un coup sec, une légère pression manuelle étant exercée en aval, en même temps que le chronomètre est déclenché.

- Suivant l'abondance de l'écoulement on utilise une pipette de 50 ou 100 µl et l'on prélève le sang très rapidement, par capillarité, jusqu'au trait; le sang est immédiatement soufflé et la pipette rincée dans le diluant en faisant mousser le moins possible (0,95 ou 1,9ml pour une dilution finale au vingtieme); on note le temps de la fin de cette manipulation (tube 1).

- Sans arrêter le chronomètre, un ou deux autres prélèvements sont effectués au regard de la même incision, dilués au cinquième ou au dixième (tubes 2 et 3); le temps de chacune de ces manipulations est noté.

- Un dernier tube est enfin prélevé pour micro-hématocrite.

Certaines règles doivent être impérativement observées au cours de ce prélèvement:

- Le réchauffement préalable est indispensable pour assurer un débit sanguin convenable.

- Le temps de prélèvement du tube 1 doit être inférieur à 30 secondes.

- Le siège de l'incision doit être essuyé entre chaque prélèvement.

- Le temps de prélèvement des tubes 2 et 3 ne doit pas excéder pour chacun 30 à 40 secondes.

- Si ces conditions, notamment pour le tube 1, ne sont pas remplies, il faut recommencer le prélèvement à partir d'une nouvelle piqûre.

B)- Prélèvement pour_microméthodes_sur_sang veineux

Après homogénéisation du contenu du tube, le sang veineux citraté est prélevé dans une micropipette de 100 µl et dilué au vingtième dans la solution diluante.

III - Traitement des échantillons

Sujets étudiés et témoin ayant été prélevés ensemble et dans les mêmes conditions, les tubes de sang dilué sont centrifugés ensemble à 5000g environ pendant dix minutes, si possible à froid (+ 4°C à +10°C). Les surnageants sont décantés, recueillis en tubes hydrofugés et conservés à +4°C jusqu'à l'exécution des dosages. Ceux-ci doivent être effectués le plus rapidement possible après le prélèvement (pas plus de trois heures). Les dosages ne peuvent être effectés après congélation des échantillons de plasma dilué.

IV - Méthodes de dosage

Pour les dosages effectués à partir du sang total dilué, la première dilution du témoin définit le 100% et les dilutions suivantes sont effectuées, comme à l'accoutumée, en tampon véronal acétate. Tous les dosages ont été effectués sur un minimum de 3 dilutions géométriques. La variation temps de coagulation/dilution est linéaire en coordonnées bilogarithmiques. La pente de la droite est caractéristique du facteur étudié. Il n'est possible de comparer les activités respectives d'un facteur déterminé dans deux échantillons que si les droites de régression obtenues à partir de chacun de ceux-ci sont strictement parallèles. Cette notion bien classique est fondamentale lorsqu'il s'agit, comme il a été fait ici, de comparer des échantillons qui n'ont pas toujours été prélevés dans les mêmes conditions.

A)- Facteurs II, V, VII et X

Ces facteurs sont dosés par les méthodes en un temps décrites par OWREN, SOULIER et LARRIEU (21); pour le dosage du facteur VII nous avons utilisé comme substrat le plasma d'un sujet ayant un déficit congénital en ce facteur; pour le facteur X la méthode de BACHMAN et coll. (2) utilisant comme substrat le plasma de boeuf privé des facteurs VII et X et, comme agent déclenchant, le Stypven, en présence d'Asolectine.

Le dosage de la prothrombine a été également effectué par la méthode de SOULIER et PROU-WARTELLE (23) utilisant la staphylocoagulase (1).

Le dosage du facteur V ne peut être effectué que sur l'échantillon prélevé moins de 30 secondes après la piqûre (cf. infra).

B)- Facteurs VIII, IX, XI et XII

Ces facteurs sont dosés par la méthode en un temps selon SOULIER et LARRIEU (22) utilisant comme substrat le plasma de sujetsayant un déficit congénital portant sur le facteur étudié et en présence de kaolin (5). Ces dosages ne peuvent être effectués que sur l'échantillon 1, comme celui du facteur V (cf. infra).

C)- Fibrinogène

Le fibrinogène est dosé suivant la méthode de CLAUSS (6, 27): lorsqu'on utilise de la thrombine concentrée pour coaguler une solution de fibrinogène très diluée,

---

(1) Staphylocoagulase STAGO

il existe une relation linéaire entre le temps de coagulation ("temps de thrombine") et la concentration du fibrinogène.

Nous avons utilisé la Thrombine ROCHE 500 u NIH/ml en tampon véronal-acétate, diluée au cinquième en Cl^2Ca 0,025M et, pour les dilutions du plasma, le tampon véronal acétate additionné d'acide epsilon-amino-caproïque à une concentration finale de 0,01M.

Méthode: avec un plasma citraté normal (hématocrite connu) dont le taux de fibrinogène a été déterminé par une autre méthode, une courbe d'étalonnage est obtenue dans le système suivant:

- plasma dilué 0,2ml
- thrombine 100 u/ml 0,2ml

Dans une certaine gamme de dilutions du plasma (du 1/5 au 1/40 ou au 1/60), il existe une relation linéaire entre le temps de la coagulation et l'inverse de la dilution du plasma (fig.1).

Les échantillons diluée sont testés de la même manière sur deux ou trois dilutions croissantes à partir de la dilution initiale et les résultats obtenus rapportés à la droite d'étalonnage. Lorsque le taux de fibrinogène est bas il est préférable de partir d'une dilution du sang capillaire au cinquième (cf. matériel à prélèvement).

Le moment précis de la coagulation est assez difficile à saisir. Pour les dilutions donnant un temps de coagulation supérieur à 20 secondes, la coagulation

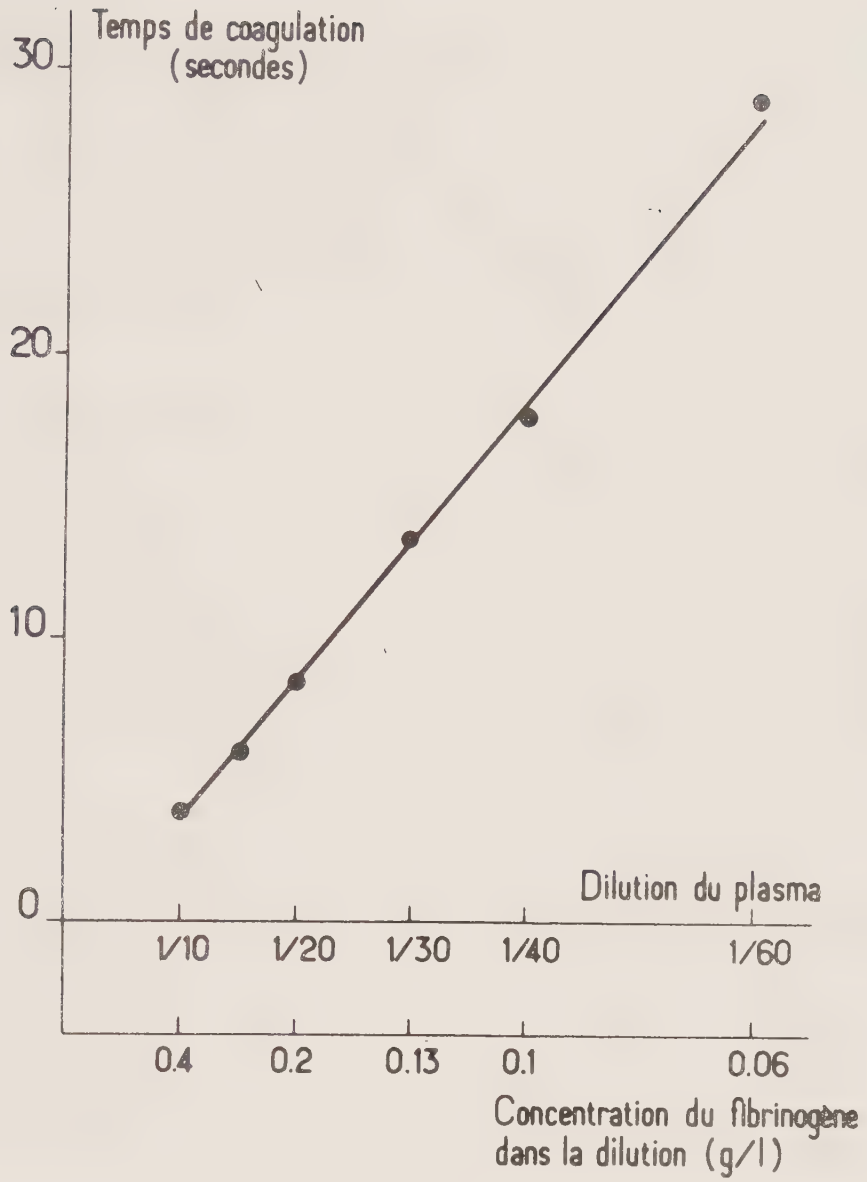

Figure 1 : Dosage du fibrinogène. Droite d'étalonnage établie avec un plasma contenant 4g/l de fibrinogène (concentration déterminée par un dosage pondéral de la fibrine coagulée par la thrombine).

Système : plasma dilué : 0,2 ml; Thrombine 100 u/ml : 0,2ml.

n'est plus marquée par la formation d'un caillot compact mais par l'apparition de filaments de fibrine; c'est à ce moment que doit être arrêté le chronomètre. Les appareils à détermination automatique des temps de coagulation (fibromètre) trouvent ici utilement leur usage.

D)- Facteur XIII

Le facteur stabilisant de la fibrine est dosé par une méthode décrite ailleurs (16), sur l'échantillon 1. Le principe de la méthode consiste à tester la solubilité, dans l'acide monochloracétique à 1%, d'un caillot obtenu par coagulation de fibrinogène dépourvu de facteur XIII en présence de l'échantillon testé plus ou moins dilué. La plus grande dilution capable de rendre le caillot insoluble (dilution limite) définit la concentration du facteur XIII dans l'échantillon. Le fibrinogène dépourvu de facteur XIII utilisé comme réactif a été préparé suivant la méthode de BROWN et ROTHSTEIN (4).

V - Facteurs de correction

Pour les dosages classiques des facteurs de la coagulation dans le plasma il est habituel de ne pas tenir compte de l'hématocrite sanguin dont dépend la dilution du plasma par le citrate. Il est en effet admis que l'erreur due à ce facteur de dilution est inférieure à l'erreur moyenne de la mesure.

Les microméthodes obligeant à une dilution importante du sang total, ce facteur ne peut plus être négligé.

Il faut donc apporter au résultat obtenu (malade/témoin) un facteur de correction égal au rapport de la dilution du plasma témoin sur la dilution du plasma du sujet à tester:

$$\text{Pourcentage réel} = \text{Pourcentage mesuré} \times \frac{\text{Dilution du témoin}}{\text{Dilution du malade}}$$

La dilution du plasma est exprimée par la formule suivante:

$$\frac{P}{(0{,}9 + \frac{P}{10}) \times 10}$$

pour une dilution du sang total au dixième.

$P = \frac{100 - H}{100}$, H étant l'hématocrite.

Pour le dosage du fibrinogène ce facteur de correction est encore plus important dans la mesure où l'on compare du sang capillaire dilué à du plasma. La dilution du plasma témoin utilisé pour l'étalonnage est ici exprimée par la formule suivante:

$\frac{9P}{(9P + 1)\ 10}$ pour une dilution du plasma citraté au 1/10.

-2- Résultats

I- Corrélations entre les résultats des microdosages effectués sur sang capillaire et sur sang veineux*; influence du temps de prélèvement.

A)- Facteurs dosés dans le "système extrinsèque" (facteurs II, V, VII et X).

1. Dosages effectués sur le prélèvement capillaire précoce (tube 1)

L'échantillon capillaire est testé par rapport à l'échantillon veineux. Les résultats sont indiqués par la figure 2. Ils portent sur 44 dosages pour le facteur V, 26 pour le facteur II et 35 pour les facteurs VII et X. Il existe une excellente corrélation entre les valeurs obtenues par la même technique sur le sang capillaire et le sang veineux. Les moyennes obtenues sont de 99% pour le facteur V, 100% pour le facteur II et 97% pour les facteurs VII et X dosés soit ensemble, soit séparément.

2. Dosages effectués sur les prélèvements capillaires tardifs (tubes 2 et 3)

Les échantillons tardifs sont testés par rapport à l'échantillon précoce. Les résultats sont indiqués par la figure 3. Ils portent sur 30 dosages pour le facteur V,

---

*: On ne peut comparer les résultats obtenus par microtechnique sur sang capillaire et sur plasma préalablement décanté; en effet les échantillons sont ici traités de manière différente et les droites de régression respectives obtenues avec les deux échantillons pour un même dosage ne sont pas toujours parallèles.

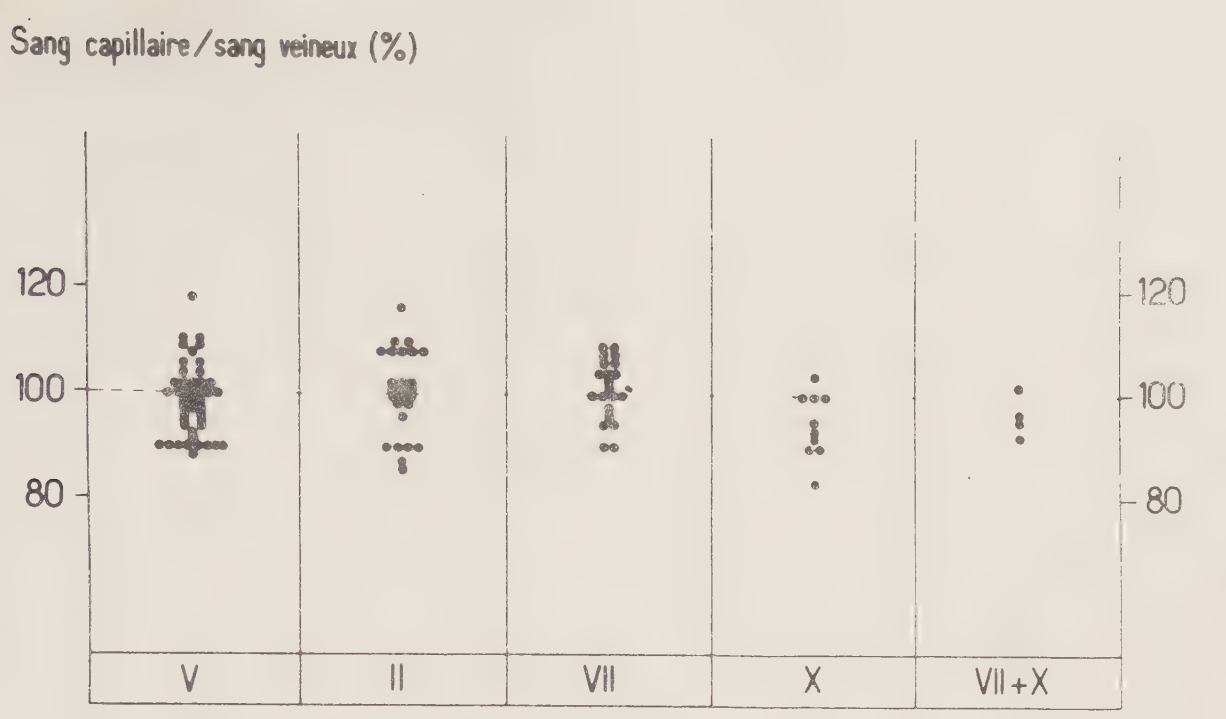

Figure 2 : Corrélations entre les résultats obtenus par microméthode sur sang capillaire et sur sang veineux citraté (facteurs II, V, VII et X). Chaque facteur est dosé sur le sang capillaire par rapport au sang veineux.

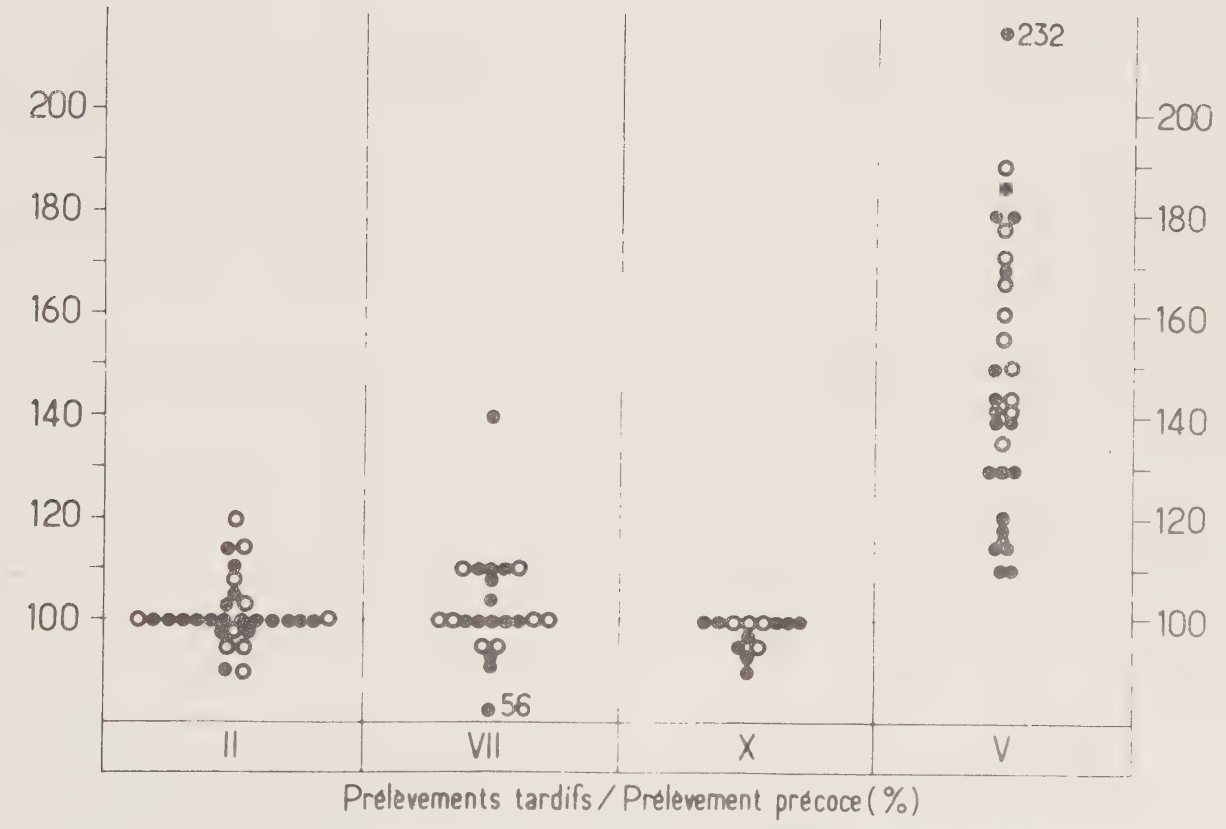

Figure 3 : Corrélations entre les résultats obtenus par microméthode sur sang capillaire en fonction du moment du prélèvement (facteurs II, V, VII et X). Chaque facteur est dosé sur les 2ème (cercles noirs) et 3ème (cercles claires) prélèvements par rapport au premier prélèvement effectué moins de 30 secondes après la piqûre.

30 pour le facteur II, 13 pour le facteur X et 23 pour le facteur VII. Les taux respectifs des facteurs II et X sont remarquablement stables d'un échantillon à l'autre (moyenne de 102% et 98%)[1]. Le taux de facteur VII est un peu plus fluctuant autour d'une moyenne de 103%. Par contre le taux de facteur V est toujours très supérieur dans les échantillons tardifs à celui déterminé dans l'échantillon initial (moyenne de 148%). En fait il ne s'agit là que de taux approchés. La droite de régression du dosage de facteur V a toujours une pente un peu plus accentuée pour les prélèvements tardifs que pour le prélèvement précoce. Cette observation a été constante chez les sujets normaux. Elle paraît traduire une activation du facteur V "in vivo" par la formation très précoce de thrombine au cours de la phase initiale de l'hémostatse. (cf. troisième partie de cette étude).

B)- Facteurs dosés dans le "système intrinsèque" (facteurs VIII, IX, XI et XII)

1. Dosages effectués sur le prélèvement capillaire précoce

Les résultats sont indiqués par la figure 4. Il existe une bonne corrélation entre les valeurs obtenues sur le sang capillaire et sur le sang veineux. Les fluctuations autour de la moyenne sont plus marquées que pour les facteurs dosés dans le "système extrinsèque".

---

(1): Chez les nouveau-nés ayant reçu de la vitamine K et chez les sujets adultes il existe une excellente corrélation entre les taux de facteur II mesurés respectivement par la méthode d'OWREN et par la Staphylocoagulase.

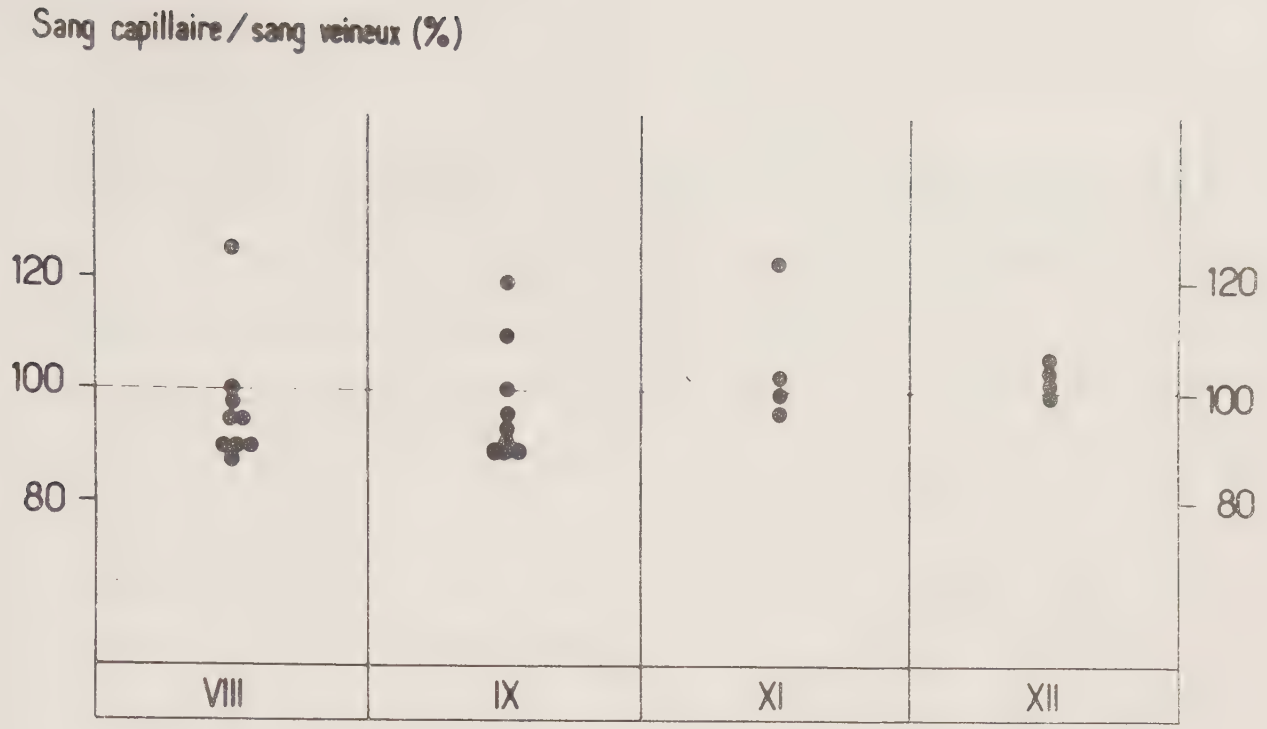

Figure 4 : Corrélations entre les résultats obtenus par microméthode sur sang capillaire et sur sang veineux citraté (facteurs VIII, IX, XI et XII). Chaque facteur est dosé sur le sang capillaire par rapport au sang veineux.

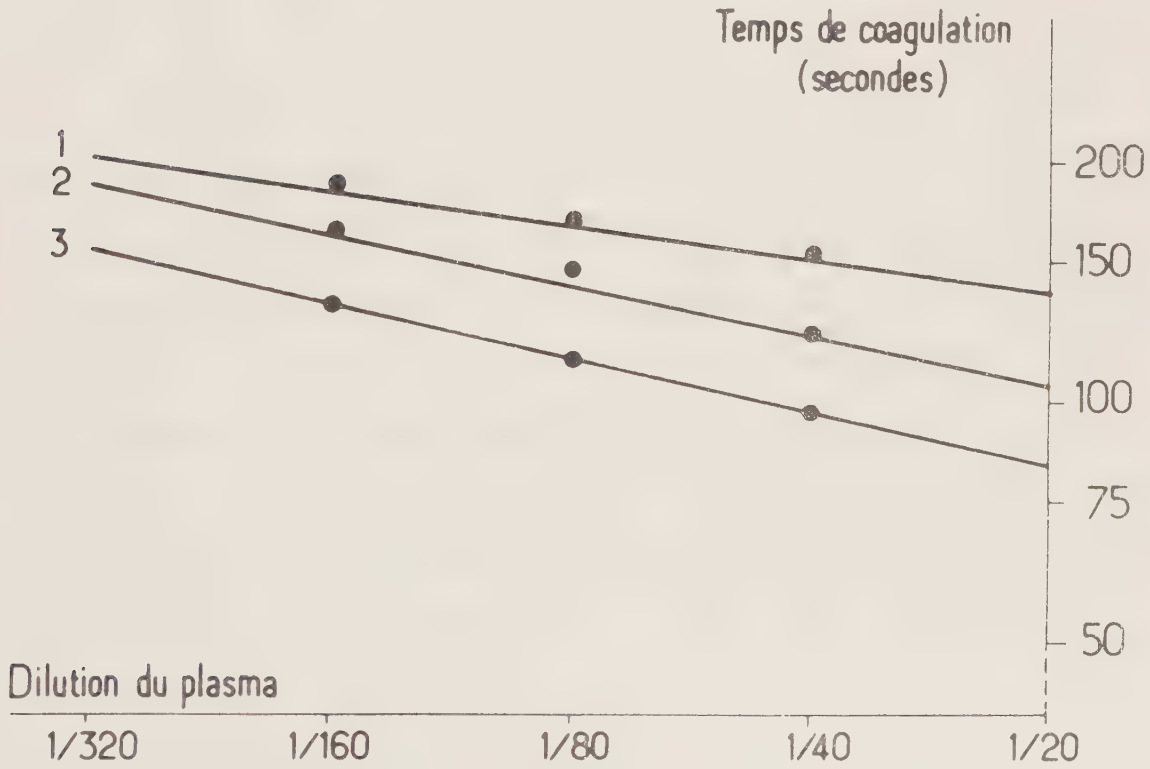

Figure 5 : Dosage du facteur VIII sur des prélèvements capillaires successifs. Prélèvement 1: 20 sec.; 2 : 70 sec.; 3 : 150 sec. après la piqûre. Les droites expriment la variation du temps de coagulation du système de dosage en fonction de la dilution du plasma testé (coordonnées bilogarithmiques).

2. Dosages effectués sur les prélèvements capillaires tardifs

On observe pour le facteur VIII le même phénomène que pour le dosage du facteur V, mais encore beaucoup plus marqué. Lorsque le tube 2 est testé par rapport au tube 1, les temps de coagulation sont nettement plus courts à dilutions égales et ceci d'autant plus que la dilution est plus faible. La droite de régression a donc une pente plus grande pour le prélèvement 2 que pour le prélèvement 1 et il est donc impossible de déterminer des taux, même approchés (figure 5). Plus le prélèvement est tardif, plus le phénomène est accentué. Divers arguments indiquent que celui-ci exprime, comme pour le facteur V, l'activation du facteur VIII par les traces de thrombine formées au cours même du prélèvement (14).

L'état d'activation du facteur VIII dans les échantillons tardifs gêne le dosage des facteurs IX, XI et XII dont les taux respectifs paraissent plus élevés que dans l'échantillon précoce avec une absence de parallélisme des droites de régression pour les faibles dilutions.
Ce phénomène est bien l'expression d'une activation du facteur VIII. Chez l'hémophile A, il n'apparaît pas "d'activité facteur VIII" dans les prélèvements tardifs et, d'autre part, le dosage des facteurs IX, XI et XII devient alors possible dans ceux-ci (tableau I).

L'activation des facteurs V et VIII s'effectue bien in vivo au lieu du saignement et n'est pas liée au fait que les prélèvements sont effectués en tubes de verre. En effet, le phénomène a été observé avec la même intensité chez un sujet ayant un déficit total en facteur XII (14).

Sujet étudié	Prélèvement	VIII	IX	XI	XII
Témoin normal	1	129	151	132	123
	2	77	128	116	104
Hémophile A	1	230	133	144	114
	2	234	130	140	117

Tableau I : Influence de l'activation du facteur VIII sur les dosages respectifs respectifs des facteurs IX, XI et XII. Chez le sujet normal et chez l'hémophile A, le prélèvement (1) a été effectué 30 secondes après la piqûre et le prélèvement (2) 115 secondes après la piqûre. Les chiffres indiquent le temps de coagulation (en secondes) du système de dosage pour la première dilution (1/20) du plasma testé.

II - Corrélations entre les résultats des microdosages sur sang capillaire et des dosages classiques

Pour chacun des sujets étudiés les facteurs plasmatiques de la coagulation ont été dosés par rapport à un même témoin sur sang capillaire et sur plasma provenant de sang veineux, décanté avant dilution. Les corrélations entre les résultats obtenus par les deux méthodes pour un même facteur ont été établies; il n'a été tenu compte de l'hématocrite que pour le dosage sur sang capillaire.

A)- Facteurs dosés dans le système extrinsèque (II, V, VII et X)

Les résultats sont exprimés par la figure 6. Ils portent sur 21 dosages de prothrombine, 16 de facteur V, 8 de complexe VII et X, 12 de facteur VII et 7 de facteur X. Il existe une excellente corrélation entre les résultats obtenus par les deux méthodes pour tous les facteurs. A quelques rares exceptions près l'écart n'excède pas 10%. Les corrélations sont d'autant meilleures que le taux est plus bas. Ces résultats incluent l'étude de déficits congénitaux portant respectivement sur chacun de ces quatre facteurs.

B)- Facteurs dosés dans le système intrinsèque (VIII, IX, XI et XII)

Les résultats sont exprimés par la figure 7. Ils portent sur 21 dosages de facteur VIII, 10 de facteur IX, 4 de facteur XI et 5 de facteur XII. La corrélation est

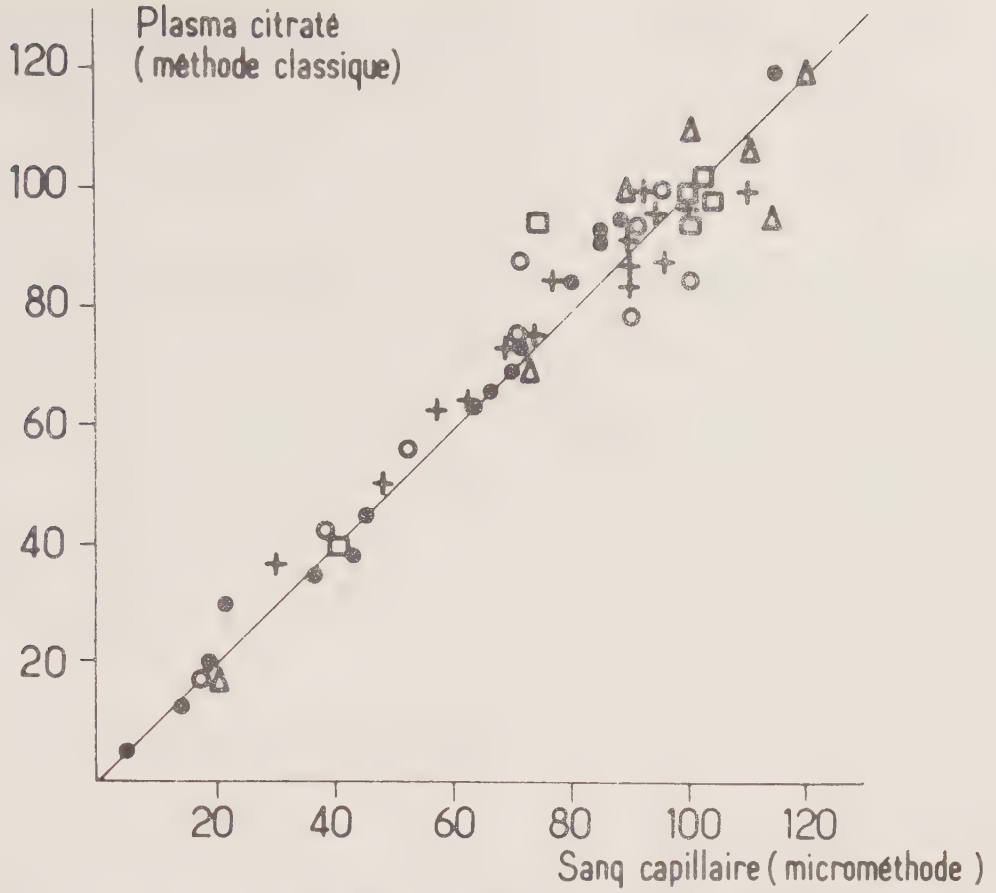

Figure 6 : Corrélations entre les résultats obtenus par microméthode sur sang capillaire et par la méthode classique sur plasma provenant d'un prélèvement veineux. (● : F.II: + : F.V; ○ : F.VII; □ : F.X; △ : "complexe VII + X").

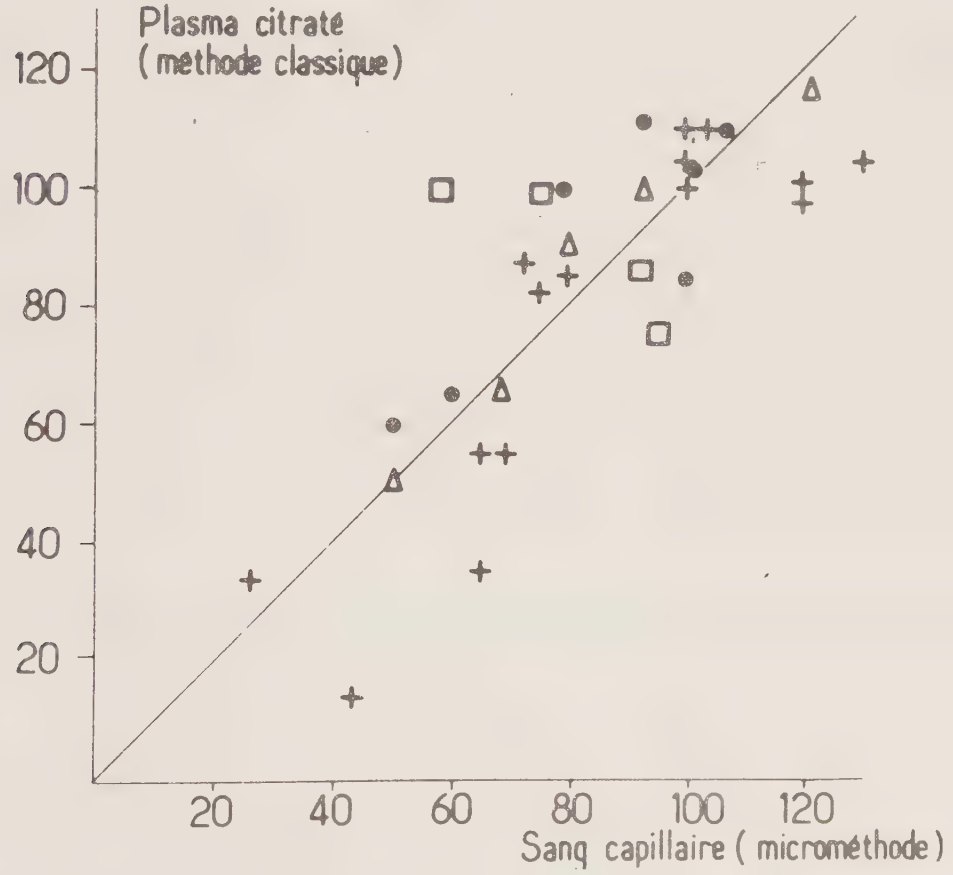

Figure 7 : Corrélations entre les résultats obtenus par microméthode sur sang capillaire et par la méthode classique sur plasma provenant d'un prélèvement veineux. N'ont pas été portés sur la figure les résultats obtenus chez les malades atteints de déficit total en facteur VIII (3 cas), IX (1 cas), XI (1 cas) et XII (1 cas). (+: F.VIII; ●: F.IX; □: F.XI; △ : F.XII).

satisfaisante entre les résultats obtenus pas les deux méthodes. Le dosage du facteur XI dans les quatre cas où il a été effectué est celui pour lequel la corrélation est la moins bonne; il importe de noter que c'est également le dosage dont les résultats sont le plus difficilement reproductibles par la méthode classique.

III - Dosage du fibrinogène

La validité de la méthode de CLAUSS est bien établie (6, 11, 27) à la condition que la mesure soit effectuée sur au moins deux dilutions du plasma pour s'assurer que l'on se trouve bien dans la gamme de dilution où la méthode est applicable (en pratique le temps de coagulation doit être de 10 à 20 secondes).

Lorsque, sur un même sujet, la méthode de CLAUSS est appliquée sur sang capillaire et sur plasma provenant d'un prélèvement veineux (par rapport à un même plasma de référence) il existe une excellente corrélation entre les résultats obtenus (figure 8). Les résultats sont les mêmes sur les prélèvements tardis et le prélèvement précoce.

IV - Dosage du facteur stabilisant de la fibrine (facteur XIII)

Chez huit sujets normaux le dosage du facteur XIII a été effectué d'une part sur prélèvement capillaire et sur prélèvement veineux, d'autre part sur des prélèvements capillaires effectués à un moment variable après la piqûre.

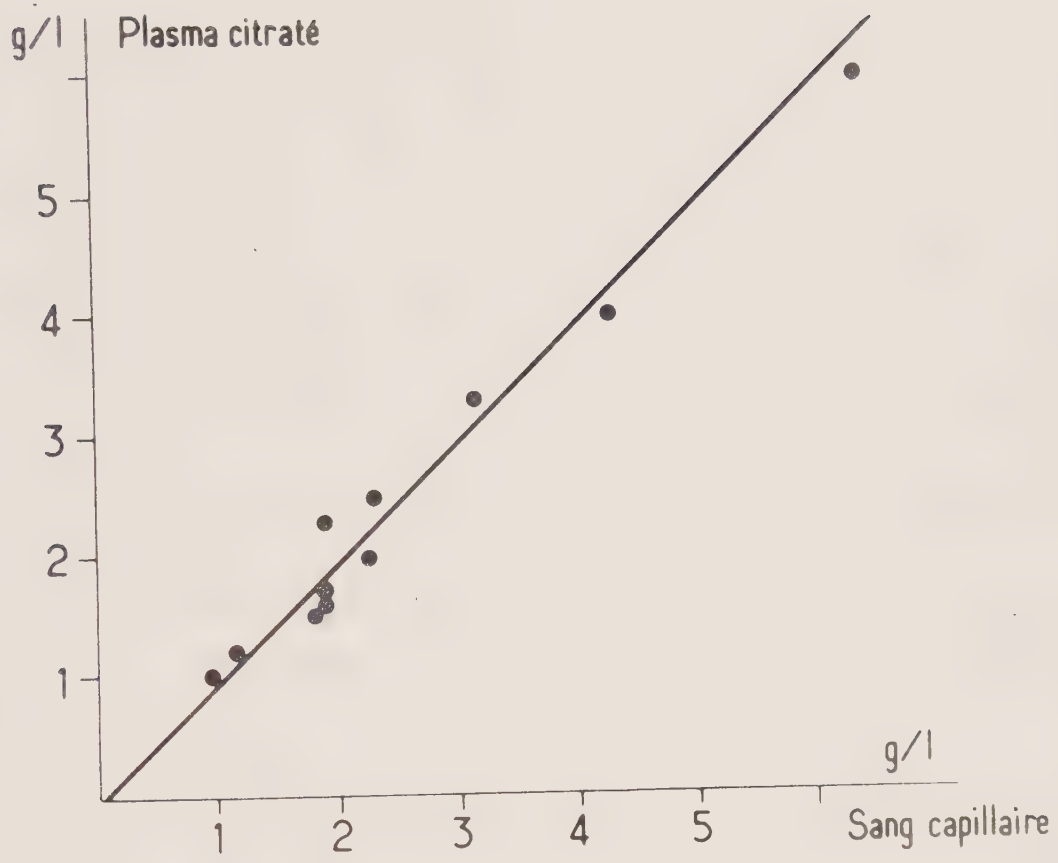

Figure 8 : Dosage du fibrinogène. Corrélations entre les résultats obtenus par la méthode de CLAUSS effectuée sur sang capillaire et sur plasma provenant d'un prélèvement veineux sur citrate.

A)- Corrélations entre les résultats obtenus sur sang capillaire et sur plasma provenant de sang veineux.

La première dilution a été obtenue pour le prélèvement capillaire par une dilution au 1/20 du sang total et pour le plasma citraté par une dilution au 1/20 également. Pour un hématocrite de 40%, les facteurs plasmatiques sont ainsi dilués 1,4 fois plus dans l'échantillon capillaire. Ceci doit suffire à expliquer, compte tenu du manque de précision de la méthode (dilutions géométriques), que la limite de solubilité a été observée chaque fois pour la dilution supérieure avec le prélèvement veineux; sauf dans un cas.

B)- Corrélations entre les résultats obtenus sur sang capillaire en fonction du moment du prélèvement

La limite de solubilité a été observée pour la même dilution sur les prélèvements 1, 2 et 3 sauf dans 2 cas où la limité de solubilité s'est trouvée déplacée à la dilution inférieure pour le prélèvement 3, le plus tardif (120 secondes environ après la piqûre).

-3- Discussion

La connaissance de la physiopathologie des troubles de l'hémostase chez le nouveau-né permet aujourd'hui de dépister la plupart de ceux-ci par un petit nombre de dosages spécifiques. Ainsi le seul dosage de la prothrombine suffit à explorer la synthèse hépatique vitamine K-dépendante; les dosages du facteur V et du fibrinogène à dépister les syndromes de coagulation intravasculaire disséminée, apparemment très fréquents chez le nouveau-né. La numération des plaquettes complète cette batterie limitée d'examens qui permet de discerner dans la très grande majorité des cas le mécanisme d'un syndrome hémorragique chez le nouveau-né. Dans les cas exceptionnels où la tendance hémorragique est due à un déficit congénital, hémophilie en particulier, les dosages spécifiques des divers facteurs de la coagulation permettent d'en faire aisément le diagnostic, une fois dépistée l'anomalie globale de la coagulation par le temps de recalcification du sang capillaire dilué citraté (cf. deuxième partie de cette étude).

Les résultats que nous avons obtenus démontrent la fiabilité du dosage des facteurs plasmatiques de la coagulation sur sang capillaire. Il existe une correlation très satisfaisante entre ces résultats et ceux que donnent les méthodes classiques sur plasma provenant d'un prélèvement veineux. Cependant certaines précautions techniques sont impératives. Le dosage des facteurs V et VIII exige

un prélèvement extrêmement rapide (moins de 30 secondes) en raison de l'activation explosive de ces facteurs au cours de l'hémostase in vivo (cf. troisième partie de cette étude). Lorsque cette condition est respectée les résultats obtenus sur sang capillaire et sur sang veineux sont superposables, notamment dans les cas où existe un déficit en ces facteurs. Les dosages respectifs de la prothrombine, du facteur VII et du facteur X sont particulièrement fiables. Le dosage du facteur IX peut être influencé par une activation du facteur VIII en cas de prélèvement tardif. Il en est de même pour le dosage des facteurs XI et XII dont l'intérêt pratique est en fait limité.

Le dosage de la prothrombine par la Staphylocoagulase est aussi fiable que la méthode classique d'OWREN. La comparaison des résultats fournis par les deux méthodes peut aider, chez le nouveau-né, à établir le diagnostic d'avitaminose K. Cette situation est en effet la seule où la méthode utilisant la Staphylocoagulase donne des résultats différents (nettement plus élevés) que la méthode classique (23).

Le dosage du fibrinogène par la méthode de CLAUSS sur sang capillaire demande un certain entraînement. Il s'agit incontestablement de la méthode de dosage la plus rapide de ce facteur (le résultat peut être obtenu quinze minutes après le prélèvement); elle nous est apparue en outre d'une bonne fiabilité. D'un point de vue théorique elle a l'inconvénient d'être sensible aux inhibiteurs de la fibrino-formation. L'usage de fortes concentrations de

thrombine et de grandes dilutions de plasma élimine l'interférence de l'héparine aux doses thérapeutiques (27). Par contre la présence dans le plasma d'inhibiteurs de la polymérisation de la fibrine peut allonger les temps mesurés et, par là, être responsable d'une erreur par défaut dans le dosage. Cet inconvénient est sensible chez le nouveau-né dont le plasma contient habituellement des produits de dégradation de la fibrine (3, 23). Cependant, à l'exception des rares cas où le trouble de la fibrino-formation est très important, il ne nous a pas semblé que la perturbation du dosage soit suffisante pour entraîner une erreur de diagnostic.

Le fait que la dilution exigée par les dosages soit effectuée directement sur le sang et non sur le plasma comme dans les méthodes habituelles oblige à tenir compte de l'hématocrite. Cette précaution est impérative pendant la période néo-natale où l'hématocrite peut varier de façon importante.

D E U X I E M E P A R T I E

ESTIMATION DE LA COAGULABILITE GLOBALE IN VITRO SUR SANG CAPILLAIRE

Le principe de la méthode est celui du classique "temps de Howell" (mesure du temps de recalcification du plasma riche en plaquettes). Ici, le sang capillaire est dilué aussitôt après le prélèvement en tampon citraté, et secondairement coagulé par addition de calcium.

Ce test diffère du temps de Howell par deux traits:
1) l'introduction d'un facteur de dilution, obligé par la miniaturisation du prélèvement;
2° l'absence de centrifugation qui constitue un avantage: gain de temps; suppression des variables introduites par les différences d'hématocrite et de sédimentation des plaquettes d'un sujet à l'autre.

Nous nous sommes attachés à standardiser ces méthodes chez des sujets normaux, et à en déterminer les applications dans diverses situations pathologiques, en comparant notamment ses résultats avec ceux de la mesure du temps de recalcification du plasma riche en plaquettes obtenu par centrifugation du sang veineux.

-1- Matériel et méthodes

I- Matériel à prélèvement

Le matériel à prélèvement est le même que celui employé pour le dosage spécifique des protéines plasmatiques de la coagulation (voir première partie de cette étude), à quelques nuances près en ce qui concerne le prélèvement capillaire.

Le matériel est en effet un peu plus réduit et comprend: micropipettes de verre calibrées de 100 µl microlances (Blood Lancet, B.D. Mérieux); pommade au silicone (Hémolube - Biolyon); chronomètre; tubes à hémolyse en verre non hydrofugé; récipient contenant de l'eau chaude (45°).

II - Réactifs

Pour la dilution du sang, nous avons utilisé la solution citratée suivante:

- tampon véronal acétate iso-osmotique au plasma pH 7,35 . . . . . 700ml
- citrate trisodique 5H2O . . . . . 300 ml

Cette formule nous a semblé la mieux appropriée à la réaction après divers essais.

Avant le prélèvement, nous préparons pour chaque sujet et pour le témoin, une série de trois tubes à hémolyse en verre, contenant chacun 0,2ml de ce diluant.

D'autre part, le réactif destiné à la recalcification du sang au moment du test est une solution de chlorure de calcium $\frac{M}{20}$.

III - Technique du prélèvement

Le début de la manipulation est le même que celui décrit dans la première partie de ce travail:
- la main ou le pied sont réchauffés trois minutes par immersion dans l'eau chaude, puis séchés et passés à l'alcool; l'endroit du prélèvement (pulpe du doigt, talon) est recouvert d'une fine couche d'Hémolube.
- Le pointe de la microlance est enfoncée d'un coup sec, une légère pression manuelle étant exercée en aval, en même temps que le chronomètre est déclenché. Une première pipette de 100 µl doit être prélevée très rapidement et rincée dans le diluant avant la trentième seconde qui suit la piqûre, et ceci de manière impérative.

Ce premier prélèvement, précoce, sera appelé T1.

Le deuxième prélèvement, identique, est effectué entre quarante-cinq et soixante-quinze secondes après la piqûre, sans avoir essuyé entre temps le point de prélèvement (T2).

Le troisieme et dernier prélèvement T3 est effectué entre quatre-vingt dix et cent vingt secondes après la piqûre, avant l'arrêt du saignement si la piqûre a été suffisante.

IV - Traitement des échantillons

Le test doit être effectué ni trop tôt, ni trop tard après le prélèvement.

Pour déterminer le délai optimum entre le prélèvement et le test, nous avons procédé de la façon suivante: deux sujets A et B sont comparés l'un à l'autre. Chez A plusieurs échantillons T1 sont prélevés simultanément et laissés sur la paillasse. B est ensuite prélevé plusieurs fois consécutives à intervalles variables. Les échantillons T1 qui en résultent sont toujours testés après un même délai suivant la piqûre, en même temps qu'un des échantillons A.

Ces expériences nous ont montré que pendant les quinze premières minutes suivant le prélèvement, les temps de coagulation étaient longs et non reproductibles. Ils restent ensuite sensiblement constants jusqu'à quatre-vingt dix à cent vingt minutes après le prélèvement, pour raccourcir secondairement en perdant leur reproductibilité (tableau II).

Ces constatations conduisent à affirmer la nécessité d'un sujet-témoin prélevé dans les mêmes conditions, et immédiatement avant ou après le sujet à examiner. Le sujet-témoin est indispensable, non seulement pour éliminer les variables dues à la technique de lecture elle-même, mais aussi pour éliminer l'influence du facteur "temps d'attente" entre prélèvement et lecture. (Ces notions sont également valables pour la mesure du temps de Howell classique).

SUJETS A

numéro des expériences	1	2	3
temps d'attente=			
10' à 15'	3'00	3'15	3'15
45' à 55'	1'50	2'45	2'35
90' à 120'	2'05	2'00	2'30

SUJETS B

numéro des expériences	1	2	3
temps d'attente=			
5'	4'15		
	5'15		
	5'30		
10'		3'00	
		2'40	
		3'15	
15'			2'20
			2'15
			2'05

Tableau II : Evolution du temps de recalcification du sang capillaire au cours du temps après le prélèvement. Comparaison de sujets A à des sujets B pris comme témoins.

Nous nous sommes aussi demandé si le fait de laisser les échantillons, avant la lecture, à la température de la glace fondante (+ 4°C), était souhaitable ou non. Aucune différence notable n'a été constatée entre les résultats obtenus après conservation à +4°C, et ceux obtenus après conservation à température ambiante. (Les autres variables, sujet, mode de prélèvement, temps d'attente étant évidemment identiques par ailleurs).

Aussi, tenant compte du fait que la température de +4°C n'est pas favorable à la conservation des plaquettes, et qu'il est plus aisé de transporter les tubes à la température ambiante, c'est cette dernière solution qui a été retenue.

V - Méthode de lecture

La lecture du temps de recalcification du sang capillaire est faite en parallèle, témoin et malade étant traités de la même façon et en même temps.

Après incubation pendant une minute environ à 37°C, on souffle 0,1 ml de chlorure de calcium $\frac{M}{20}$ dans chaque tube en déclenchant un chronomètre. Les tubes sont laissés trente secondes, puis inclinés doucement toutes les quinze secondes jusqu'à ce que le caillot soit pris en masse.

Il faut souligner ici que l'agitation plus ou moins grande des tubes pendant la lecture peut modifier très sensiblement le temps de coagulation, ce qui vient encore appuyer la nécessité d'une lecture commune témoin-malade.

Il faut enfin noter le caractère non ponctuel de la phase terminale de la coagulation ("end-point"). Celle-ci correspond en effet à la polymérisation de la fibrine, phénomène progressif, et qui sera d'autant plus long que le temps de coagulation lui-même sera allongé.

La précision de la lecture, pour des temps normaux, ne peut donc admettre une limite inférieure à quinze secondes; elle est d'autant moins bonne que le temps de lecture est plus long.

-2- Résultats

I - Valeurs normales

A)- Résultats chez les sujets normaux: étude d'un échantillon de cent trente sujets

Les limites de normalité du temps de recalcification du sang capillaire ont été définies d'après un échantillon de cent trente sujets choisis comme témoins selon les critères suivants: il s'agissait d'adultes réputés en bonne santé, sans aucun traitement susceptible d'influencer la coagulation.

Par référence à l'activation précoce des facteurs V et VIII, les normes ont été établies sur le premier prélèvement de chaque série, que nous avons appelé T1.

La figure 9 montre la répartition de ces cent trente sujets. On voit que les temps de recalcification du sang capillaire pour le prélèvement T1 vont de 1 minute 30 secondes à 4 minutes.

Les caractéristiques de cette répartition sont les suivantes:

- moyenne de T1 = 2'20
- écart-type = 33 secondes,

ce qui conduit à dire que 95% des sujets de la population générale "normale" a un temps de recalcification du sang capillaire (pour le prélèvement précoce T1) compris entre une minute quinze secondes et trois minutes trente cinq secondes.

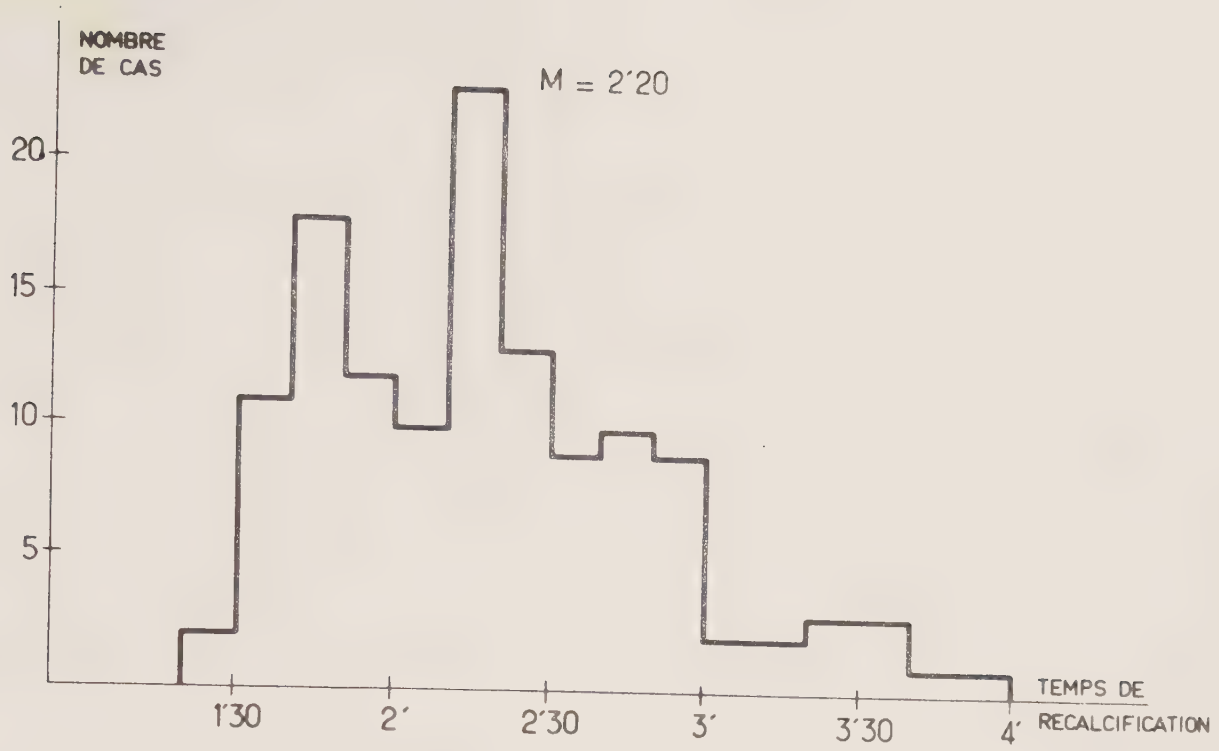

Figure 9 : Répartition des résultats du temps de recalcification du sang capillaire d'après un échantillon de cent trente sujets normaux.

Pour le couple n°	1	2	3	4	5
La différence a été retrouvée avec un écart de	0	45	15	5	5 secondes

Tableau III : Reproductibilité du temps de recalcification du sang capillaire : étude de dix sujets témoins répartis en cinq couples.

Les critères de normalité sont donc assez larges, mais dépendent en partie, rappelons-le, du temps écoulé entre prélèvement et lecture, et de la manière dont sont agités les tubes lors de la lecture.

Cet histogramme laisse apparaître l'existence possible de deux populations parmi ces sujets dits normaux.

Cependant on ne possède pas assez d'éléments pour donner une signification à cette constatation.

B)- Reproductibilité

La reproductibilité du test a été étudiée chez dix sujets témoins, prélevés deux par deux, deux fois consécutives, et testés chaque fois l'un par rapport à l'autre.

L'écart entre les temps de coagulation respectifs pour un couple de sujets a peu varié d'une expérience à l'autre (cf. tableau III).

Sur ces cinq résultats, le deuxième est médiocre, mais les quatre autres entrent dans la marge d'erreurs de lecture que nous avons indiquée plus haut.

C)- Comparaison avec le temps de recalcification du plasma riche en plaquettes

Nous avons comparé temps de recalcification du sang capillaire et temps de recalcification plasmatique (ou temps de Howell classique) en les prélevant au même moment chez les mêmes sujets.

Les dix-sept sujets normaux étudiés ainsi montrent qu'il existe une bonne corrélation entre ces deux tests dont les résultats sont parfaitement groupés (figure 10). On peut remarquer un étalement plus grand des points dans le sens horizontal ce qui correspond à l'éventail plus large des résultats normaux pour le temps de recalcification sur sang capillaire que pour le temps de recalcification plasmatique.

On a voulu enfin comparer la reproductibilité du temps de recalcification du sang capillaire à celle du temps de recalcification plasmatique en faisant deux lectures des deux prélèvements par chaque méthode chez le même sujet, avec des conditions d'expérience identiques. La reproductibilité est la même pour les deux tests.

Au terme de cette étude comparative entre temps de recalcification du sang capillaire et temps de recalcification plasmatique, on peut donc affirmer que l'un comme l'autre ne sont pas des tests précis, mais que leur valeur est la même.

D)- Activation normale de la coagulation au cours du saignement

Nous avons vu plus haut l'utilité de faire trois prélèvements successifs après la piqûre, et ceci avec un chronomètrage précis.

En effet, on constate un raccourcissement des temps de coagulation au fur et à mesure que le prélèvement est plus tardif après la piqûre.

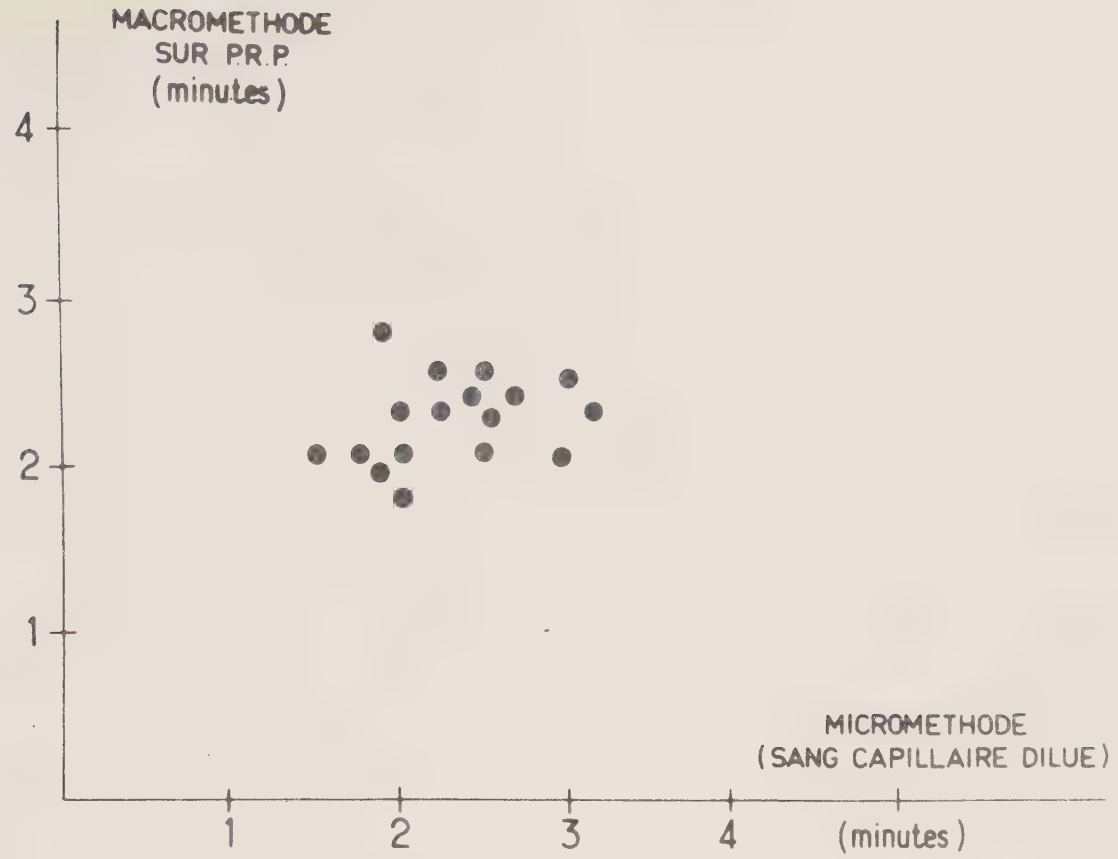

Figure 10 : Estimation de la coagulabilité globale chez dix-sept sujets normaux en comparant micro et macro-méthode.

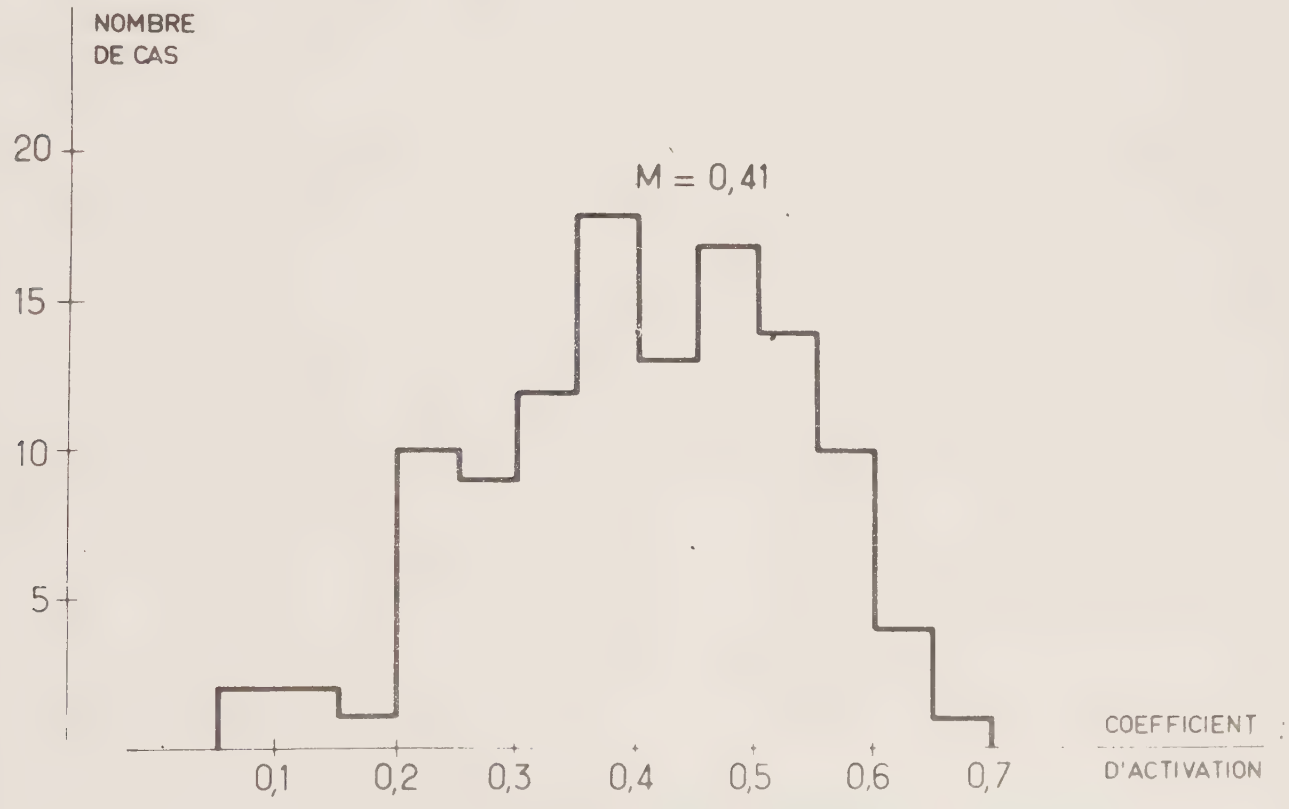

Figure 11 : Temps de recalcification du sang capillaire : activation de la coagulation "in vivo" d'après un échantillon de cent treize témoins normaux.

Ce raccourcissement a été défini par le "coefficient d'activation" qui correspond à la formule $\frac{T1 - T3}{T1}$, si T1 est le temps de recalcification du sang capillaire prélevé moins de trente secondes après la piqûre, et T3 le temps de recalcification du dernier prélèvement (fait une minute trente secondes à deux minutes après la piqûre).

Ce coefficient d'activation a été étudié chez cent treize sujets de la population témoin citée plus haut.

Il varie suivant les sujets (normaux) dans les limites suivantes (figure 11):

$\frac{T1 - T3}{T1}$ minimum= 0,09

$\frac{T1 - T3}{T1}$ maximum = 0,66

Les caractéristiques de cette répartition sont les suivantes:

- moyenne = 0,41
- écart-type = 0,12

ce qui veut dire que 95% des sujets de la population générale "normale" ont un coefficient d'activation compris entre 0,16 et 0,66. *

Il est indispensable, dans l'interprétation du résultat d'un temps de recalcification du sang capillaire, de tenir compte de ce raccourcissement ou "activation" entre le premier et le dernier prélèvement.

---

* De même que dans l'histogramme précédent, on remarque ici l'existence possible de deux populations de sujets normaux, sans qu'il soit possible avec les données présentes d'interpréter cette constatation.

La signification de cette activation ne sera discutée que dans la troisieme partie de ce travail, mais auparavant, on pourra se rendre compte de son importance en étudiant le temps de recalcification chez les sujets pathologiques, et en particulier les hémophiles.

II - Pathologie

La mesure du temps de recalcification du sang capillaire dilué a pour objet de compléter l'étude analytique des principaux facteurs de la coagulation. Elle peut ainsi avoir valeur de test de dépistage, et doit permettre de ne pas méconnaître un déficit portant sur un facteur autre que ceux dosés en routine.

Aussi avons-nous testé divers cas de pathologie congénitale ou acquise de l'hémostase, notamment des hémophiles.

A)- Pathologie congénitale de la coagulation

1. Déficit en facteurs anti-hémophiliques

L'étude de neuf sujets ayant un déficit complet en facteur VIII (taux inférieur à 1% du taux normal) a donné les résultats suivants:

	Temps le plus long	Temps le plus court	Moyenne	Témoins
T1	11'20	3'40	6'05	1'35 et 1'55
T2	9'35	3'45	6'05	1'10 et 1'15
T3	7'35	3'25	5'45	1'15 et 1'00

On constate donc qu'il existe un allongement important des temps de recalcification du sang capillaire par rapport aux sujets témoins.

Par ailleurs, si on calcule les coefficients d'activation $\frac{T1 - T3}{T1}$, ils sont très faibles, avec une moyenne de 0,15, très inférieure aux limites déterminées dans la population témoin.

L'étude de sujets porteurs du même déficit complet en facteur VIII mais ayant subi une substitution récente, c'est-à-dire une remontée artificielle de leur taux de facteur VIII par injection de fraction spécifique, ne porte que sur deux sujets. Elle donne les résultats suivants:

	M1	M2	Témoin
T1	2'15	2'00	1'40
T2	1'55	1'40	1'00
T3	1'15	1'25	55"
Coefficient d'activation	0,44	0,29	0,45

Ici, donc, les temps sont revenus dans des limites normales.

On a ensuite étudié de manière semblable dix sujets ayant un déficit complet en facteur IX. Ce qui a donné les résultats suivants:

	Temps le plus long	Temps le plus court	Moyenne	Témoins
T1	8'45	3'30	5'45	1'35-1'40-1'40
T2	8'00	3'10	5'50	1'10-1'25-1'00
T3	11'50	3'10	6'20	1'15-1'05-55"

Les mêmes conclusions peuvent être tirées de ces chiffres en ce qui concerne les sujets hémophiles A non substitués: allongement notable des temps par rapport aux témoins.

L'étude de leurs coefficients d'activation montre que celle-ci est encore moins forte chez ces sujets hémophiles B que chez les précédents (moyenne: -0,08 - le signe - signifie ici que le troisième temps du temps de recalcification du sang capillaire est souvent supérieur au premier).

Afin de préciser l'effet d'un déficit en facteur VIII sur le temps de recalcification du sang capillaire, on a voulu voir ce que donnaient les déficits modérés en facteurs anti-hémophiliques.

Pour ce faire, ont été étudiés:

- deux sujets dits "hémophiles atténués", c'est-à-dire dont le taux de facteur VIII était bas, mais supérieur à 1% (le facteur IX ayant un taux égal ou supérieur à 100%). (Cas 1 et 2).
- Un sujet porteur d'une maladie de Willebrand; (cas 3).

- Cas 1
  =====

L'un des sujets hémophiles atténués est un nouveau-né porteur d'un hématome péritesticulaire à la naissance, sans autre forme de saignement. Un temps de recalcification du sang capillaire fait au cours d'un bilan de l'hémostase au 13° jour de vie a donné le résultat suivant:

T1 = 2'45

T2 = 2'20

T3 = 2'25

donc un premier temps normal, mais un coefficient d'activation faible (0,13).

Le dosage des facteurs anti-hemophiliques, suggéré par cette anomalie inhabituelle, a montré que cet enfant avait un taux de 6% de facteur VIII.

- Cas 2

Le deuxième sujet hémophile atténué est un garçon de 15 ans, dont le facteur VIII était à un taux de 12%.

Le temps de recalcification plasmatique était de 3'05 pour 2'30 chez le témoin, et le temps de recalcification du sang capillaire dilué de 2'10 pour 1'40, avec un coefficient d'activation de 0,07, valeur particulièrement basse en regard des résultats des tests de coagulabilité globale qui restaient dans les limites de la normale.

- Cas 3

Le dernier sujet porteur d'un déficit modéré en facteur VIII est une femme atteinte de maladie de Willebrand. Son taux de facteur VIII, mesuré le jour où le temps de recalcification du sang capillaire a été fait, était de 4%.

Ce dernier montre un allongement modéré du premier temps (2'40 pour 1'40 chez le témoin), mais surtout un coefficient d'activation très faible:

T1 = 2'40
T2 = 2'35
T3 = 2'25

$$\frac{T1 - T3}{T1} = 0,09$$

Pour conclure cette étude des sujets porteurs d'un déficit en facteur anti-hémophilique, on remarquera que le temps de recalcification du sang capillaire n'est

franchement allongé que dans les grands déficits inférieurs à 1%, mais surtout que le calcul du coefficient d'activation est un test très sensible, susceptible de suggérer l'existence d'une anomalie de la coagulation en dehors de tout allongement significatif du temps de recalcification du sang capillaire.

2. Autres déficits congénitaux

a) Le temps de recalcification a été pratiqué sur deux sujets porteurs d'un déficit en facteur V (pro-accélérine):

- Cas 4

Le premier patient était un garçon de 5 ans, souffrant d'un syndrome hémorragique modéré. Le taux de facteur V a été trouvé à 1,5% le jour où nous l'avons étudié.

Temps de recalcification du sang capillaire:

T1 = 8'		2'30	
T2 = 8'	pour	2'00	chez le témoin
T3 = 8'		1'45	

donc, un allongement important des temps, et un coefficient d'activation nul.

- Cas 5

Le deuxième patient était une jeune fille de 25 ans souffrant également d'un syndrome hémorragique relativement modéré. Le taux de facteur V était inférieur à 1%.

Son temps de recalcification du sang capillaire montrait: T1 = 3'35 2'10

T2 = 4'15 pour 1'45 chez le témoin

T3 = 3'45 1'10

donc, un allongement modéré des temps, mais un coefficient d'activation négatif (-0,04).

La même malade, après avoir reçu du plasma frais, avait un taux de facteur V de 10%.

Son temps de recalcification du sang capillaire montrait alors:

T1 = 2'00 1'55

T2 = 2'00 pour 1'45 chez le témoin.

T3 = 1'50 1'25

donc, un premier temps devenu égal à celui du témoin, mais un coefficient d'activation encore faible (0,08), quoique supérieur au précédent.

On peut donc retenir, à propos des sujets porteurs d'un déficit en facteur V, un allongement plus ou moins important des temps par rapport au témoin, allongement qui se corrige si on remonte artificiellement ce taux de facteur V; et surtout un coefficient d'activation très inférieur à la normale, partiellement corrigé par la correction partielle du déficit.

b) Un autre déficit congénital a été étudié par le temps de recalcification du sang capillaire.

Il s'agit du déficit en facteur XI (ou P.T.A., ou facteur de Rosenthal).

- Cas 6

Le temps de recalcification du sang capillaire du malade était: T1 = 8'30 3'30

T2 = 8'30 pour 2'30 chez le témoin

T3 =10'30 2'00

donc un allongement important des temps, et un coefficient d'activation négatif (-0,19).

B)- Thrombopénies

L'étude de l'influence d'une thrombopénie (nombre de plaquettes inférieur à 100 000 par millimètre cube) sur le temps de recalcification du sang capillaire a porté sur douze nouveau-nés; ceux-ci présentaient une thrombopénie isolée, c'est-à-dire sans anomalie associée portant sur les facteurs de la coagulation.

Cliniquement, l'existence d'une tendance anormale au saignement a été retrouvée huit fois sur douze.

La mesure des temps de recalcification et du coefficient d'activation de ces sujets a montré:

- que l'allongement des temps en valeur absolue, par rapport à ceux du témoin, varie beaucoup d'un sujet à l'autre, et ceci sans aucun parallélisme entre l'importance de la thrombopénie et celle de l'allongement ($2' \leq T1 \leq 10'$);
- que le coefficient d'activation est, lui aussi, très variable, puisque le plus élevé est de 0,80, alors que le plus bas est de -0,07. Ici non plus, aucun parallélisme n'est retrouvé entre l'importance de la thrombopénie et la valeur du coefficient d'activation;

On ne peut donc conclure de manière simple en ce qui concerne l'interprétation du temps de recalcification du sang capillaire chez un sujet porteur d'une thrombopénie. Il est en effet hautement probable que la qualité des plaquettes, et surtout sans doute le mécanisme de la thrombopénie entrent au moins autant en jeu que leur nombre dans la détermination du temps de recalcification du temps capillaire. (Il en est d'ailleurs de même pour le temps de recalcification plasmatique).

III - Traitements anti-coagulants

Comme pour le temps de recalcification plasmatique, l'un des grands intérêts du temps de recalcification du sang capillaire semble être la surveillance des malades soumis à un traitement anticoagulant, et plus précisément à une héparinothérapie. Mais avant de détailler ce chapitre, nous avons voulu étudier le temps de recalcification du sang capillaire chez des sujets soumis à un traitement anticoagulant par les antagonistes de la vitamine K.

A)- Antagonistes de la vitamine K

Nous avons joint à notre étude celle d'enfants atteints de "maladie hémorragique du nouveau-né", c'est-à-dire qui présentaient spontanément quelques jours après la naissance un déficit important en facteurs synthétisés en présence de vitamine K (dont les facteurs II et VII + X, dosés en examen de dépistage courant).

Notre étude porte donc sur 17 sujets, dont 15 étaient soumis à un traitement (tromexane, sintron, coumadine, pindione), et deux étaient des nouveau-nés atteints de

maladie hémorragique, avec un déficit exprimé par un taux inférieur à 20% pour l'un au moins des facteurs du groupe de la prothrombine.

Chez la plupart de ces sujets, nous avons pratiqué en parallèle les examens suivants:

- temps de recalcification du sang capillaire
- temps de recalcification plasmatique
- temps de Quick.

1. La comparaison du temps de recalcification plasmatique et du temps de recalcification du sang capillaire

montre qu'il existe une bonne corrélation entre ces deux tests chez les sujets soumis à un antagoniste de la vitamine K (figure 12).

On note seulement un étalement plus large dans le temps des résultats obtenus par le temps de recalcification du sang capillaire, remarque que nous avons déjà faite à propos des sujets témoins étudiés plus haut.

Ceci est d'autant plus accentué que l'allongement est plus marqué: plus l'hypocoagulabilité du sujet est franche, et plus le temps de recalcification du sang capillaire a tendance à donner des temps plus longs que le temps de recalcification plasmatique. Ce qui montre une plus grande sensibilité du temps de recalcification du sang capillaire dans les cas de grande hypocoagulabilité.

2. Comparaison de la coagulabilité globale d'un sujet avec son temps de Quick

Nous avons ensuite voulu voir s'il existait une relation entre le temps de recalcification du sang capillaire

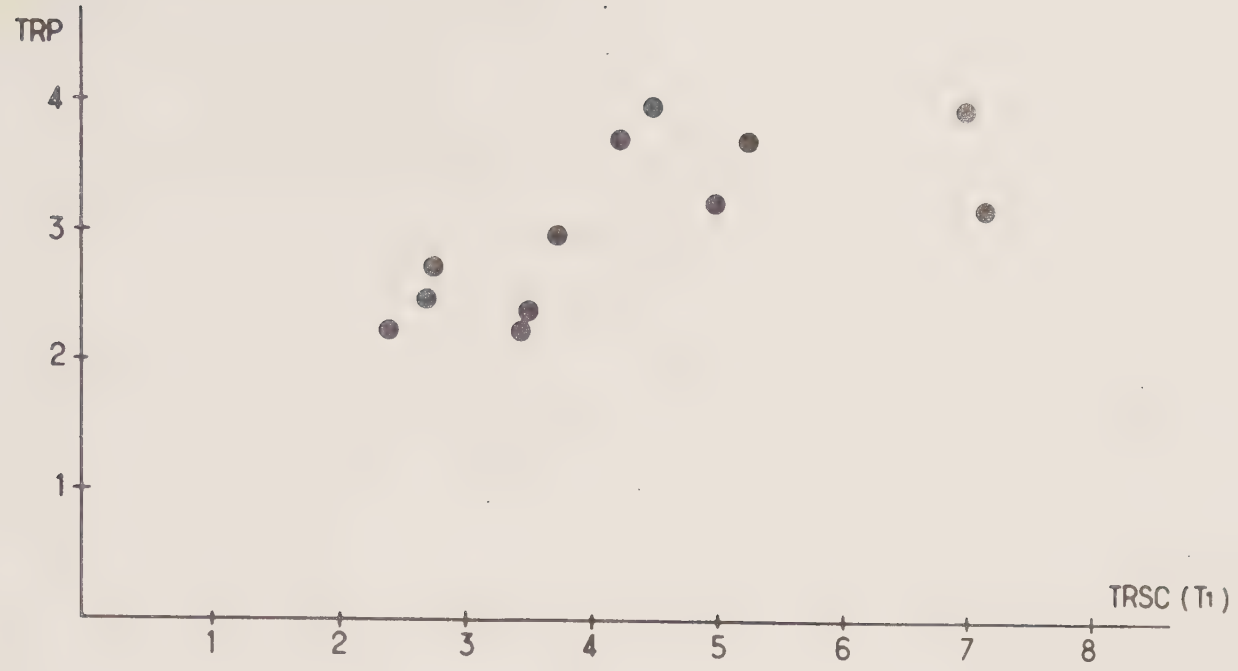

Figure 12 : Etude comparative du temps de recalcification plasmatique et du temps de recalcification du sang capillaire chez douze sujets soumis à un antagoniste de la vitamine K.

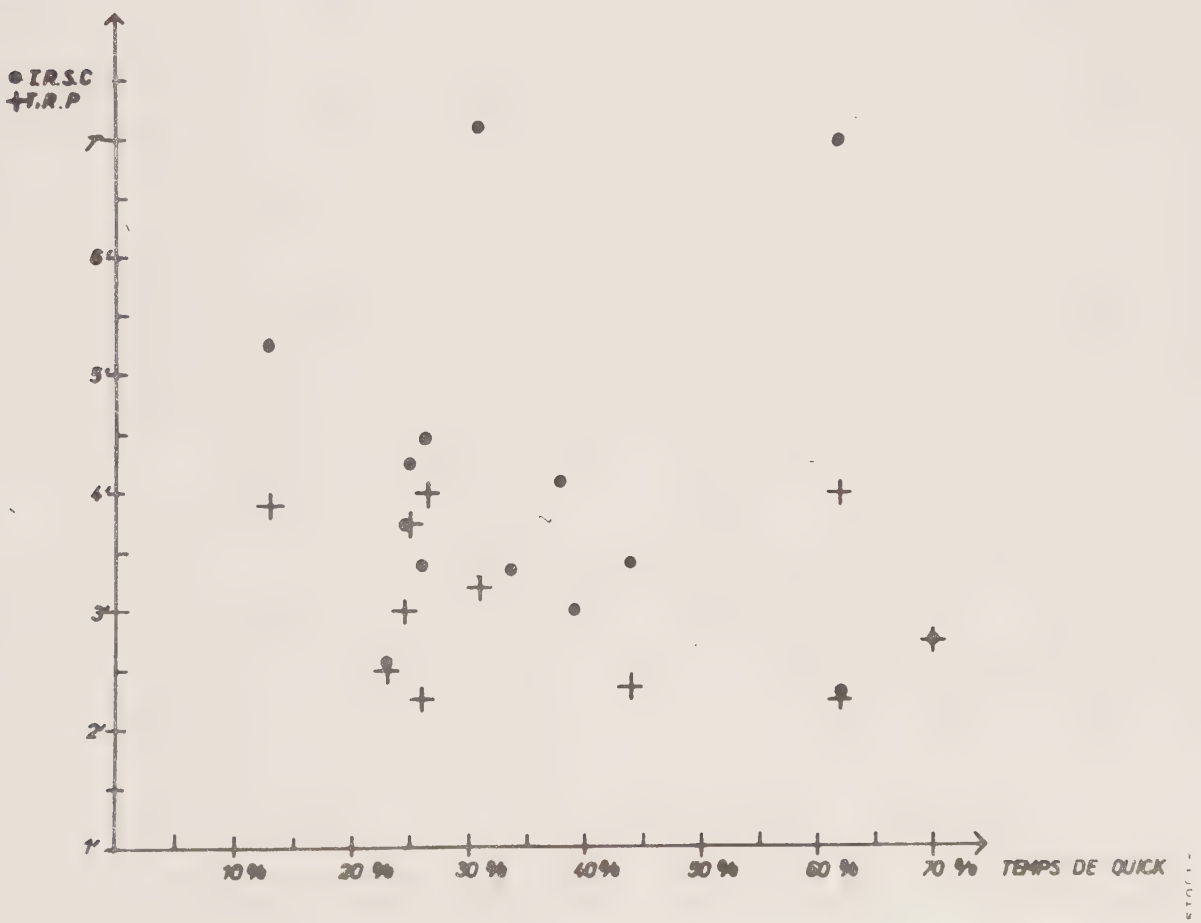

Figure 13 : Etude comparative de la coagulabilité globale et du temps de Quick chez quatorze sujets soumis aux antagonistes de la vitamine K.

et le temps de recalcification plasmatique, d'une part, et le temps de Quick de ces sujets, d'autre part, ce dernier test reflétant seul le déficit en facteurs vitamine K - dépendants (figure 13). Mais le calcul montre que le taux de corrélation entre coagulabilité globale et temps de Quick chez un même sujet n'est pas significatif.

B)- Héparinothérapie

1. Comparaison du temps de recalcification plasmatique et du temps de recalcification du sang capillaire.

Nous avons voulu tout d'abord comparer les résultats obtenus par le temps de recalcification du sang capillaire à ceux obtenus par le temps de Howell classique, puisque c'est ce dernier test qui est utilisé dans la surveillance des traitements par l'héparine (7).

Vingt-sept sujets soumis à une héparinothérapie ont été examinés parallèlement par le temps de recalcification plasmatique et par le temps de recalcification du sang capillaire (figure 14).

On constate:

- d'une part, qu'il existe une très bonne corrélation entre les résultats obtenus par chacun de ces deux tests;
- d'autre part, que les temps obtenus par le temps de recalcification du sang capillaire sont un peu plus longs que ceux lus en temps de Howell classique pour un même sujet. (cette remarque a déjà été faite et commentée plus haut).

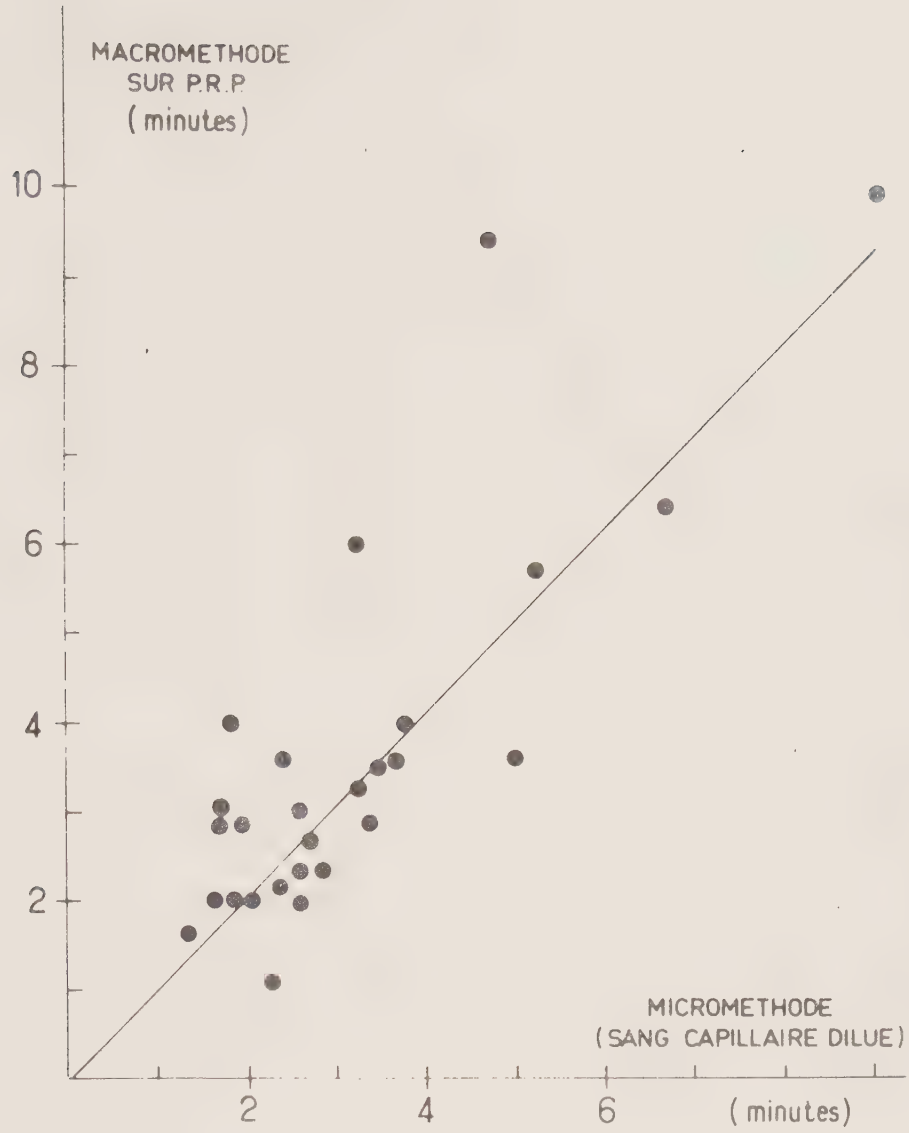

Figure 14 : Estimation de la "coagulabilité globale" chez vingt-sept sujets soumis à l'héparinothérapie.

2. Comparaison de la coagulabilité globale d'un sujet sous héparine avec son temps de thrombine.

On a voulu ensuite comparer le temps de recalcification plasmatique d'une part, et le temps de recalcification du sang capillaire d'autre part, avec le temps de thrombine obtenu au même moment chez les mêmes sujets. Le temps de thrombine est ici considéré comme témoin de l'héparinémie du sujet testé. (figure 15).

Il n'y a pas de corrélation entre le temps de thrombine et la coagulabilité globale du sujet, qu'elle soit testée par le temps de Howell classique ou par le temps de recalcification du sang capillaire. Cette observation n'a rien pour surprendre, si l'on prend en considération le contraste entre l'extrême sensibilité du temps de thrombine à l'héparine, et la faible sensibilité du temps de recalcification.

3. Etude du coefficient d'activation des sujets soumis à une héparinothérapie.

L'étude des temps de recalcification du sang capillaire chez les sujets recevant de l'héparine a été poursuivie en examinant le coefficient d'activation de soixante-dix de ces sujets (coefficient défini, rappelons-le, par la formule $\frac{T1 - T3}{T1}$ si T1 est le premier temps du test et T3 le dernier temps) (figure 16).

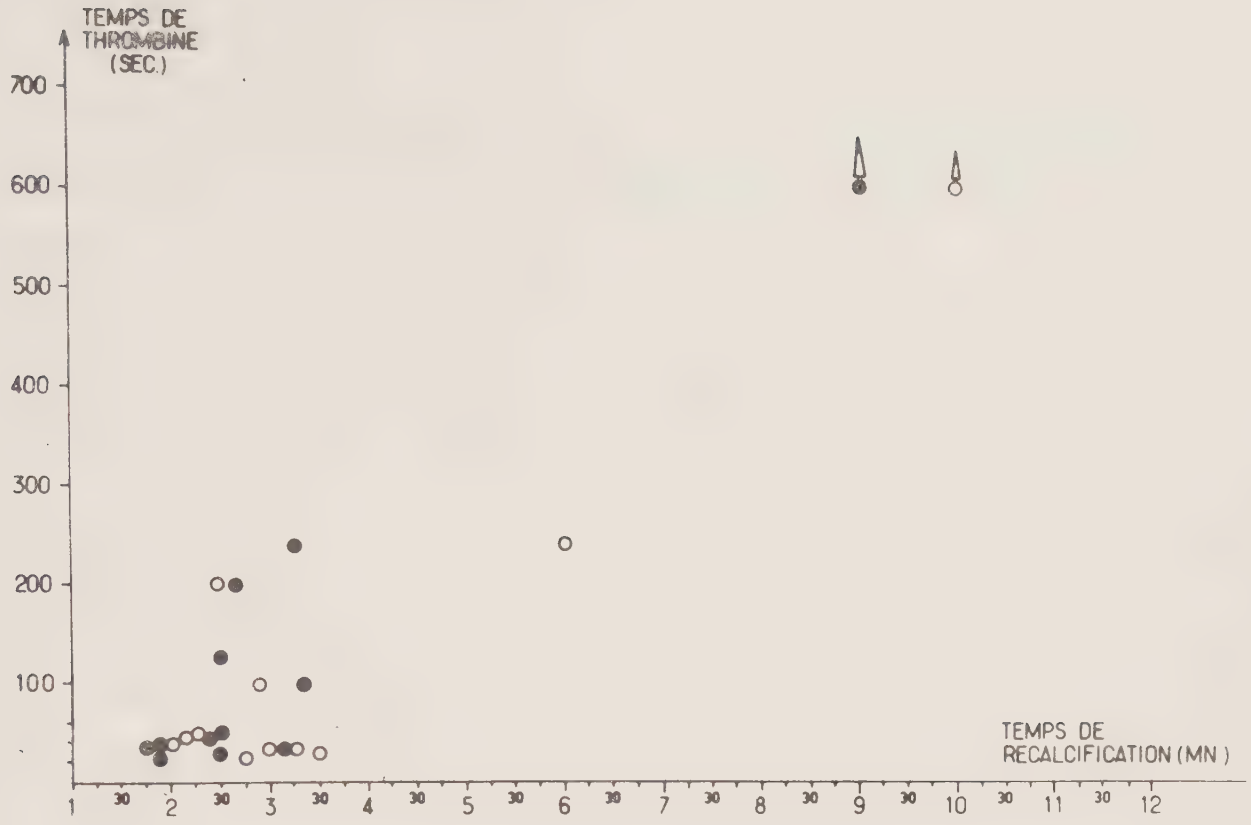

Figure 15 : Etude comparative du temps de recalcification plasmatique (points noirs) d'une part et du temps de recalcification du sang capillaire (points blancs) d'autre part, avec le temps de thrombine obtenu au même moment chez les mêmes sujets.

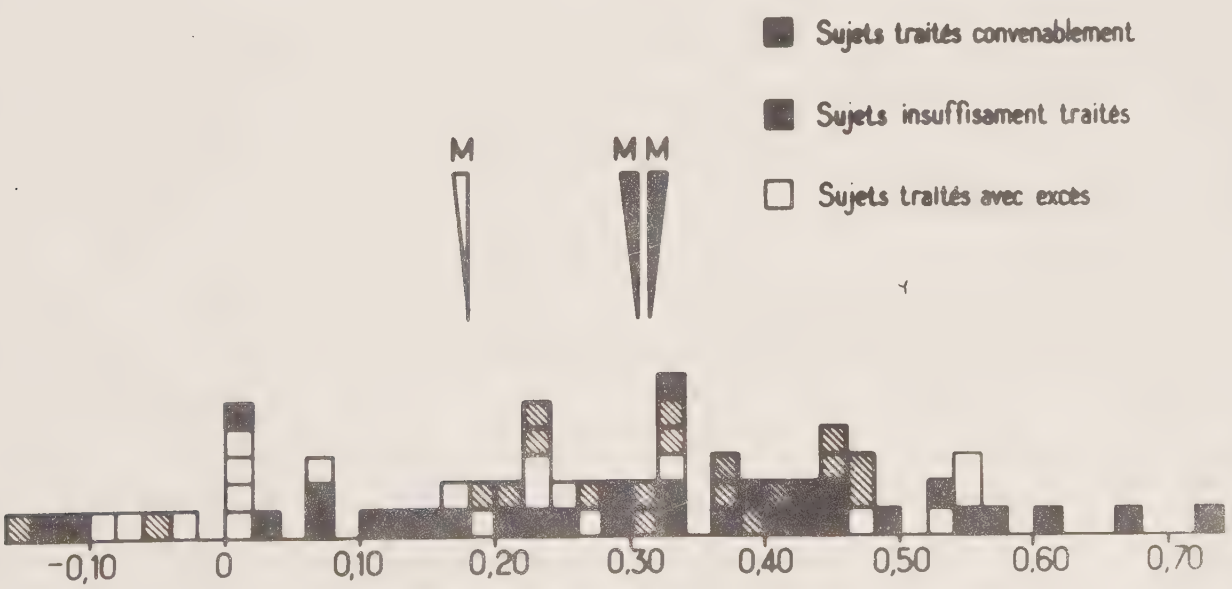

Figure 16 : Etude du coefficient d'activation "in vivo" chez soixante-dix sujets soumis à une héparinothérapie. (M = moyenne).

Par souci d'homogénéité, les soixante-dix sujets examinés ont été répartis en trois populations en fonction de l'efficacité de leur traitement:

- le premier groupe comprend les sujets insuffisamment traités, dont le premier temps du test est inférieur à la moyenne obtenue chez les témoins (2'20);
- le second groupe est celui des sujets bien traités, dont le premier temps du test est compris entre 2'20 et 4'40; cette dernière limite a été déterminée par référence au temps de Howell classique, où l'on exige comme témoin d'une bonne héparinothérapie un temps égal à deux fois ceux du témoin;
- le troisième groupe enfin comprend les sujets traités de manière excessive, dont le premier temps est supérieur à 4'40.

On constate alors que le coefficient d'activation des deux premières populations se regroupent autour de la même moyenne (0,30), alors que la moyenne du coefficient d'activation de la troisième population est nettement plus basse (0,18).

Ceci tendrait à montrer que l'hypocoagulabilité franche d'un sujet va de pair avec une diminution de son coefficient d'activation.

4. Comparaison du coefficient d'activation d'un sujet sous héparine avec la coagulabilité globale de celui-ci

Afin de vérifier l'hypothèse soulevée dans le précédent paragraphe, on a voulu comparer chez les mêmes sujets traités par l'héparine:

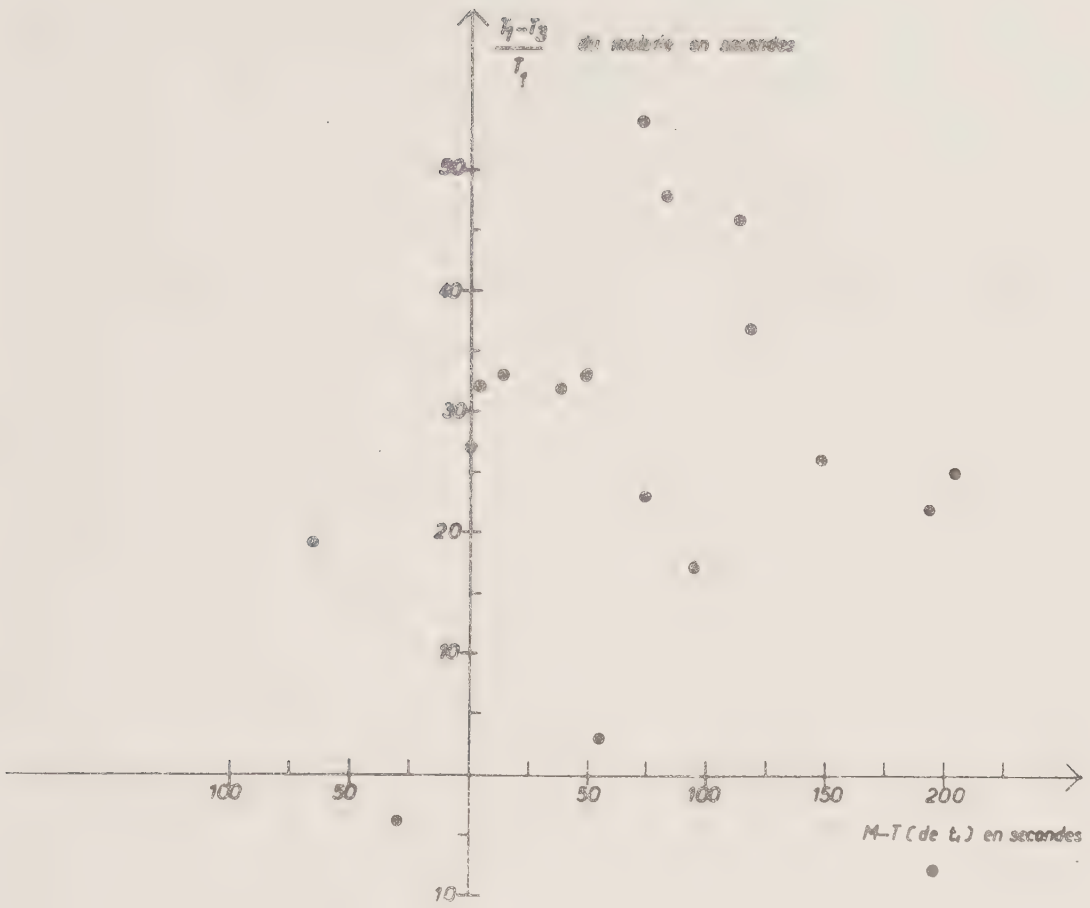

Figure 17 : Etude comparative du coefficient d'activation et de l'allongement malade/témoin du premier temps de recalcification du sang capillaire chez vingt sujets soumis à une héparinothérapie.

- l'allongement en secondes du premier temps de recalcification du sang capillaire par rapport à celui du témoin;
- et le coefficient d'activation du sujet traité (figure 17).

Cependant, la corrélation entre ces deux données n'atteint pas un taux significatif et ne permet pas de conclure qu'il existe une relation simple entre l'hypocoagulabilité d'un sujet et son coefficient d'activation.

-3- Discussion

Il apparaît que le temps de recalcification du sang capillaire dilué citraté a la même signification et la même valeur diagnostique que celui du plasma riche en plaquettes obtenu par centrifugation du sang veineux.

Sa précision n'est pas meilleure, mais non moindre. La relative imprécision de ces tests globaux tient à la complexité des réactions mises en jeu, et au caractère non ponctuel de la fin de la réaction terminale qui est la polymérisation de la fibrine, phénomène progressif.

La reproductibilité de ce test est satisfaisante.

Ses variations dans la population normale sont assez larges, un peu plus que pour le temps de Howell classique.

Cependant, tout ceci ne reste vrai que dans la mesure où les conditions du prélèvement et de lecture indiquées plus haut sont strictement respectées: temps de prélèvement rigoureusement exacts; témoin et malade prélevés ensemble et traités de manière identique; lecture faite par le technicien qui a prélevé, ce qui permet une critique des résultats obtenus.

Ces conditions de travail très strictes font que, dans la pratique le temps de recalcification du sang capillaire est en fait plus fiable que le temps de Howell classique, pour lequel on est généralement moins exigeant,

alors que ses résultats varient aussi beaucoup avec la qualité du prélèvement, et suivant le moment auquel le est est lu par rapport à celui du prélèvement (le même raccourcissement des temps est en effet constaté).

Application clinique

Le temps de recalcification du sang capillaire peut avoir en clinique les mêmes applications que celles du temps de Howell classique:

- dépistage des troubles de la coagulation dans le système intrinsèque - en particulier celui des hémophiles-. Mais là non plus, le temps de recalcification du sang capillaire n'est pas plus sensible que le temps de Howell classique, puiqu'il n'est pas allongé chez l'hémophile atténué.

On peut seulement remarquer que, dans ce cas, l'activation du temps de recalcification du sang capillaire est diminuée (cf. troisième partie).

- Mais on retiendra surtout l'interêt majeur du temps de recalcification du sang capillaire dans la surveillance de l'héparinothérapie chez l'enfant à qui l'on peut difficilement prélever quotidiennement une quantité non négligeable de sang veineux.

T R O I S I E M E P A R T I E

SIGNIFICATION DE L'ACTIVATION DU SYSTEME DE LA COAGULATION IN VIVO

Dans la première partie de ce travail il a été montré que, parmi les facteurs plasmatiques de la coagulation, les facteurs V et VIII subissaient une activation importante au stade initial de l'hémostase primaire, dès la première minute du saignement. De nombreux arguments suggèrent que cette activation est liée à la formation très précoce de traces de thrombine au siège de l'effraction vasculaire, dès le début du saignement. Il suffit notamment de l'injection de quantités très faibles d'héparine au sujet (0,1 mg/Kg) pour supprimer complètement ce phénomène.

L'examen de sujets ayant un déficit congénital apparemment total en l'un des facteurs de la coagulation a permis, au cours d'une étude parallèle à ce travail, de déterminer les conditions nécessaires à cette formation précoce de thrombine (14). L'activation ne se produit pas en l'absence de facteur VII, de facteur VIII, de facteur V, de facteur X. Elle ne nécessite pas la présence des facteurs XII, XI et IX (ni celle du fibrinogène et du facteur XIII).

Ainsi tout se passe comme si les premières traces de thrombine formées au moment de l'effraction vasculaire

résultaient du déclenchement, par le facteur tissulaire, du système dit "extrinsèque" de la coagulation: nécessité du facteur VII, rôle nul des facteurs XI et XII.
Dans cette hypothèse, le rôle nécessaire du facteur VIII est paradoxal par référence au schéma habituellement admis de la coagulation "in vitro". Tout se passe comme si le facteur VIII intervenait "in vivo" comme co-facteur de la "thromboplastine" tissulaire.

De prime abord le raccourcissement progressif du temps de recalcification du sang capillaire au cours du saignement paraît exprimer le même phénomène, l'activation des facteurs V et VIII provoquant l'accélération de la coagulation. L'intervention d'un tel mécanisme est certain dans la mesure où l'activation des facteurs V et VIII entraîne par définition une accélération de la formation de la thrombine dans le plasma normal. Néanmoins plusieurs arguments semblent démontrer que cette interprétation ne couvre pas l'ensemble des faits observés.

1)- Les sujets ayant un déficit en facteur IX (10 cas) et en facteur XI (1 cas) activent leur facteur VIII "in vivo" sans que se raccourcisse le temps de recalcification du sang capillaire.

Cette observation est compatible avec l'hypothèse selon laquelle la présence de facteur IX comme de facteur XI est indispensable à l'expression "in vitro" d'une activation du facteur VIII.

2)- Dans l'ensemble l'héparinothérapie minimise le raccourcissement du temps de recalcification du sang

capillaire au cours du saignement. Cependant, nombreux sont les cas où, malgré un temps de recalcification fort long indiquant une posologie "efficace" de l'héparine, l'accélération de la coagulation au cours du saignement se produit à peu près normalement.

Deux hypothèses peuvent être évoquées:

a)- L'activation du facteur IV antihéparinique plaquettaire au cours du processus de l'hémostase primaire peut rendre compte d'une neutralisation relative de l'héparine au siège du saignement et, par là, d'une réduction de l'allongement du temps de recalcification.

b)- Le "release" du facteur III phospholipidique plaquettaire au cours du processus de l'hémostase primaire peut rendre compte de l'accélération de la coagulation du sang total au cours du saignement malgré la suppression par l'héparine de l'activation des facteurs V et VIII.

En conclusion:

Le raccourcissement du temps de recalcification du sang capillaire au cours du saignement serait ainsi la résultante d'au moins deux phénomènes:

a)- l'activation des facteurs V et VIII par la thrombine;

b)- l'activation du facteur 3 plaquettaire.

D'autre part, le raccourcissement du temps de recalcification du sang capillaire au cours du saignement chez les sujets traités par l'héparine serait l'expression de l'activation du facteur 4 plaquettaire au cours de l'hémostase primaire.

Ainsi la détermination de l'indice d'activation de la coagulation au cours du saignement pourrait peut-être constituer une épreuve d'exploration de certains facteurs des plaquettes au cours de l'hémostase. Elle pourrait peut-être aussi fournir un élément d'appréciation du pouvoir "antithrombotique" d'une héparinothérapie.

C O N C L U S I O N S

1)- Le dosage spécifique des dix protéines plasmatiques de la coagulation connues est aisément réalisable sur du sang capillaire obtenu par microprélèvement au doigt ou au talon. Les résultats des dosages ainsi effectués sont tout à fait superposables à ceux que donnent les techniques usuelles sur sang veineux. La qualité de ces résultats dépend de celle du prélèvement qui doit être extrêmement précoce après la piqûre.

2)- La mesure du temps de recalcification du sang capillaire dilué citraté permet une estimation convenable de la coagulabilité globale. Les résultats ainsi obtenus ont la même valeur que ceux fournis par la mesure du classique "temps de Howell", temps de recalcification du plasma riche en plaquettes provenant de sang veineux ou artériel. Cet examen a deux applications principales:
- orientation du choix des dosages spécifiques des facteurs de la coagulation (dépistage de l'hémophilie par exemple)
- surveillanve biologique des traitements anticoagulants et notamment de l'héparinothérapie.

3)- Cette étude a permis de mettre en évidence certaines modifications que subit le système de la coagulation au stade initial de l'hémostase, exprimées globalement par le raccourcissement progressif du temps de recalcification du sang capillaire au cours du saignement.

Ce phénomène résulte de l'intervention d'au moins deux mécanismes concomittants :

- activation du facteur plaquettaire 3 (et du facteur 4) au cours de l'hémostase primaire
- activation à ce même stade des facteurs V et VIII par la formation extrêmement précoce de thrombine déclenchée par le facteur tissulaire.

L'analyse de ces phénomènes ouvre une voie originale pour l'étude des mécanismes de l'hémostase physiologique, permettant de prévoir la mise au point de méthodes nouvelles d'exploration fonctionnelle.

R E F E R E N C E S

1 - ALSTATT L., DENNIS L., SUNDELL H., MALAN A., HARRISSON V., HEDVALL G., EICHELBERGER J., FOGEL B., STAHLMAN M., Disseminated intravascular coagulation in the new-born. Relation to hyaline membrane disease.

2 - BACHMAN F., DUCKERT F., KOLLER F., 1958.- Le dosage du facteur Stuart-Prouver et sa signification clinique. Thromb. Diath. Haemorrh., 2,2.

3 - BONIFACI E., BAGGIO P., GRAVINA E., 1968.- Demonstration of split-products of fibrinogen in the blood of normal new-born. Biol. Neonat., 12,29.

4 - BROWN M.E., ROTHSTEIN F., 1967.- Fibrinogen from human plasma preparation by precipitation with heavy-metal coordination complex. Science, 155, 1017.

5 - CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M., 1968.- L'hémostase. Méthode d'exploration et diagnostic pratique. L'Expansion Scientifique, ED.

6 - CLAUSS A., 1957.- Gerinnungsphysiologische schnell methode zur bestimmung des fibrinogenes. Acta Haemat., 17, 237.

7 - CORNU P., 1971.- Héparine: effets physiologiques, modalités d'administration et éléments de surveillance. Gaz. Med. France., 78, 1709.

8 - DORMANDY K.M., HARDISTY R.M., 1061.- Coagulation tests on capillary blood. A screening procedure for use in small children. J. Clin. Path., 31, 42.

9 - FERON J.F., SAINT-MARTIN J., JOSSO F., CLOUP M., FOURNIER J.P., HUAULT G., 1971.- Coagulopathies de consommation chez l'enfant (en dehors de la période néo-natale). Arch. franç. Pediat., 28, 5.

10 - FRESH J.W., FERGUSON J.H., STAMY C., MORGAN F.M., LEWIS T.H., 1957.- Proaccelerin in normal infancy questionable relationship to vit. K. Pediatrics, 19, 2.

11 - GMUR J.P., VON FELTEN A., STRAUB P.W., 1970,- Blutgerinnung und fibrinolyse im nahelschnurblut. Befunde im abpunkturten. Nahelschnurblut von 140 neugeborenen. Thromb. Diath. Haemorrh., 23, 347.

12 - HARDISTY R.M., MACPHERSON J.C., 1962.- A one stage factor VIII (antihaemophilic globulin) assay and its use on venous and capillary plasma. Thromb. Diath. Haemorrh., 7, 215.

13 - HATHAWAY W., MULL M., PECHET G., 1969.- Disseminated intravascular coagulation in the new-born. Pediatrics.,43,233

14 - HURLET A., JOSSO F.- Factors V and VIII activation in vivo during bleeding. Evidence of thrombin formation at the early stage of primary hemostasis. (à paraître)

15 - JANSSEN C.L., VON LEEUWEN W.H., 1971.- Sequential activation of clotting factors during bllod coagulation. Nature., 233, 193.

16 - JOSSO F., PROU-WARTELLE O., ALAGILLE D., SOULIER J.P., 1964.- Le déficit congénital en facteur stabilisant de la fibrine (facteur XIII). Etude de deux cas. Nouv. Rev. franç. Hemat., 4, 267.

17 - MARKARIAN M., LINDLEY A., JACKSON J.J., BANNON A., 1967.- Coagulation factors in pregnant women and premature infants with and without respiratory distress syndrome. Thromb. Diath. Haemorrh., 17, 585.

18 - SAINT-MARTIN J., HUAULT G., JOSSO F., JOLY J.B., KACHANER J., FERON J.F., 1971.- Coagulopathies de consommation chez le nouveau-né. Arch. franç. Ped., 28, 17.

19 - SOULIER J.P., 1944.- Sur une microméthode de dosage de la prothrombine. Paris Med., 34, 233.

20 - SOULIER J.P., 1948.- La consommation de la prothrombine pendant la coagulation du sang veineux et du sang capillaire. Nouvelle méthode d'investigation des syndromes hémorragiques. Etude de 57 cas. Rev. Hemat., 3, 302.

21 - SOULIER J.P., LARRIEU M.J., 1952.- Etude analytique des temps de Quick allongés. Dosage de prothrombine, de proconvertine et de proaccelerine. Sang, 23, 459.

22 - SOULIER J.P., LARRIEU M.J., 1953.- Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage du facteur anti-hémophilique A et B. Sang, 24, 205.

23 - SOULIER J.P., PROU-WARTELLE O., 1966.- Etude comparative des taux de co-facteur de la staphylocoagulase (CRF) et des taux de facteur II (prothrombine) dans diverses conditions. Nouv. Rev. franç. Hemat., 6, 623.

24 - STIEHM E.R., CLATANOFF D.U., 1969.- Split products of fibrin in the serum of new-born. Pediatrics, 43, 770.

25 - SUCHON N., 1967.- Apport des microméthodes dans l'exploration de la coagulation sanguine chez le nouveau-né. Etude de 54 nouveau-nés normaux. Thèse Doct. Med. Lyon, 168p.

26 - SUCHON N., THOUVEREZ J.P., BELLEVILLE J., 1968.- Microméthodes applicables à l'étude de la coagulation chez le nouveau-né. Coagulation, 1, 361.

27 - VERMYLEN C., DE VRECKER K.A., VERSTAETE M., 1963.- A simple method for the instantaneous quantitation of fibrinogen the FPT test. Clin. Chim. Acta., 8, 418.

28 - VERMYLEN C., VERSTRAETE M., 1968.- A simple method for the assay of factor VIII using 20 microlitres of capillary blood. Brit. J. Haemat., 14, 241.

Vu, le Président de Thèse

Signé: J.P. Soulier

Vu, le Président de l'U.E.R.

Signé: F. Delbarre

Vu et permis d'imprimer,

Le Recteur de l'Académie de Paris

Signé: R. Mallet